illumina®

Guida per l'utente del sistema HiSeq® 1000

SOLO A USO DI RICERCA

DI PROPRIETÀ DI ILLUMINA

N. codice 15023355 Rev. K ITA
Maggio 2013

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende a essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente a uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti in alcun modo, senza preventiva approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento Illumina non trasferisce alcuna licenza sui propri diritti su brevetti, marchi di fabbrica, copyright, o diritti secondo il diritto consuetudinario, né alcun diritto similare di alcun terzo.

Il Software viene concesso in licenza conformemente alle condizioni del contratto "Illumina Sequencing Software License Agreement" fornito in un documento separato. Se l'utente non accetta le condizioni specificate in tale contratto, Illumina non concede la licenza d'uso del Software e l'utente deve astenersi dall'installare o utilizzare il Software.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente addestrato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE PUÒ CAUSARE DANNI AL PRODOTTO, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEI PRODOTTI QUI DESCRITTI (COMPONENTI E SOFTWARE INCLUSI) O DA QUALSIASI USO DI TALI PRODOTTI NON ESPLICITAMENTE CONTEMPLATO NELLE LICENZE SCRITTE O NELLE AUTORIZZAZIONI CONCESSE DA ILLUMINA IN OCCASIONE DELL'ACQUISIZIONE DEI PRODOTTI STESSI DA PARTE DEL CLIENTE.

SOLO A USO DI RICERCA

© 2013 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Illumina, **IlluminaDx**, **BaseSpace**, **BeadArray**, **BeadXpress**, **cBot**, **CSPro**, **DASL**, **DesignStudio**, **Eco**, **GAIIx**, **Genetic Energy**, **Genome Analyzer**, **GenomeStudio**, **GoldenGate**, **HiScan**, **HiSeq**, **Infinium**, **iSelect**, **MiSeq**, **Nextera**, **NuPCR**, **SeqMonitor**, **Solexa**, **TruSeq**, **TruSight**, **VeraCode**, la tonalità di arancione e la grafica Genetic Energy del fluire delle basi sono marchi o marchi registrati di Illumina, Inc. Tutti gli altri marchi e nomi qui contenuti sono di proprietà dei rispettivi titolari.

Questo software contiene la libreria SeqAn, concessa in licenza a Illumina e distribuita conformemente alle condizioni della seguente licenza:

Copyright © 2010, Knut Reinert, FU Berlin. Tutti i diritti riservati. Sono consentiti la ridistribuzione e l'uso nei formati sorgente e binario, con o senza modifiche, purché siano rispettate le condizioni di seguito riportate:

1 La ridistribuzione del codice sorgente deve contenere le informazioni sul copyright riportate sopra, il presente elenco di condizioni e le limitazioni di responsabilità riportate di seguito.

2 La ridistribuzione in formato binario deve contenere le informazioni sul copyright riportate sopra, il presente elenco di condizioni e le limitazioni di responsabilità riportate di seguito nella documentazione e/o in altro materiale fornito con la distribuzione.

3 I nomi "FU Berlin" e "Knut Reinert" non devono essere utilizzati per appoggiare o promuovere prodotti derivati da questo software senza previa ed esplicita autorizzazione scritta.

QUESTO SOFTWARE VIENE FORNITO DAI TITOLARI DEI DIRITTI D'AUTORE E DAI LORO COLLABORATORI "NELLO STATO IN CUI SI TROVA" SENZA ALCUNA GARANZIA ESPRESSA O IMPLICITA, INCLUSE IN VIA ESEMPLIFICATIVA, LE GARANZIE DI COMMERCIABILITÀ O IDONEITÀ A UNO SCOPO SPECIFICO. IN NESSUN CASO I TITOLARI DEI DIRITTI D'AUTORE E I LORO COLLABORATORI POTRANNO ESSERE RITENUTI RESPONSABILI DI EVENTUALI DANNI DIRETTI, INDIRETTI, INCIDENTALI, SPECIALI, ESEMPLARI O CONSEQUENZIALI, (INCLUSI, A MERO TITOLO ESEMPLIFICATIVO, I COSTI DI APPROVVIGIONAMENTO DI BENI O SERVIZI SOSTITUTIVI, I DANNI RISULTANTI DA INDISPONIBILITÀ, PERDITE DI DATI, PERDITE DI RICAVI O DA INTERRUZIONE DELL'ATTIVITÀ COMMERCIALE) INDIPENDENTEMENTE DALLA CAUSA E A PRESCINDERE DALLA INTERPRETAZIONE GIURIDICA, CHE INVOCHI INADEMPIMENTO CONTRATTUALE, EXTRACONTRATTUALE O LA RESPONSABILITÀ OGGETTIVA (INCLUSI I CASI DI NEGLIGENZA O ALTRO) DERIVANTI DALL'UTILIZZO DEL PRESENTE SOFTWARE, ANCHE NEL CASO IN CUI SIANO STATI INFORMATI

DELLA POSSIBILITÀ DEL VERIFICARSI DI TALI DANNI.

Leggere prima di usare questo prodotto

Questo prodotto, il suo utilizzo e disposizione, sono soggetti ai seguenti termini e condizioni. Se l'acquirente non concorda con questi termini e condizioni, l'acquirente non è autorizzato da Illumina ad utilizzare questo prodotto e l'acquirente non deve utilizzare questo prodotto.

1 **Definizioni**. "**PI per applicazioni specifiche**" indica diritti di proprietà intellettuale controllati o di proprietà di Illumina che riguardano questo prodotto (e il suo utilizzo) solo in relazione ad ambito/i o applicazione/i specifiche. La PI per applicazioni specifiche esclude ogni proprietà intellettuale controllata o di proprietà di Illumina relativa a elementi o caratteristiche di questo prodotto (o del suo utilizzo) che siano comuni a tutte le possibili applicazioni e a tutti i possibili ambiti di utilizzo di questo prodotto (di seguito, la "**PI base**"). La PI per applicazioni specifiche e la PI base sono sottoinsiemi separati e non coincidenti, nemmeno in parte, di tutti i diritti di proprietà intellettuale posseduti o controllati da Illumina. A titolo esemplificativo ma non esaustivo, i diritti di proprietà intellettuale di Illumina per metodi diagnostici specifici, per metodi forensi specifici, o per biomarcatori del DNA, sequenze o combinazioni di biomarcatori o sequenze specifiche sono esempi di PI per applicazioni specifiche. "**Materiali di consumo**" indica i reagenti e i materiali di consumo a marchio Illumina, destinati a essere utilizzati insieme e in combinazione con l'hardware. "**Documentazione**" indica il manuale per l'utente Illumina per questo prodotto, inclusi senza limitazioni, foglietti illustrativi e altra documentazione di accompagnamento per questo prodotto o a cui il prodotto fa riferimento o nella confezione del prodotto in vigore alla data di spedizione del prodotto da Illumina. La documentazione include questo documento. "**Hardware**" indica strumenti, accessori o periferiche Illumina. "**Illumina**" indica Illumina, Inc. o un'affiliata Illumina, come applicabile. "**Prodotto**" indica il prodotto che accompagna questo documento (ad esempio, hardware, materiali di consumo o software). "**Acquirente**" è la persona o l'entità che acquisisce legittimamente e legalmente questo prodotto da Illumina o da un rivenditore autorizzato Illumina. "**Software**" indica il software con marchio Illumina, ad esempio, software operativo per l'hardware o software di analisi dei dati. Il software viene concesso in licenza e non venduto e può essere soggetto a condizioni ulteriori indicate nel contratto di licenza per l'utente finale. "**Specifiche**" indica le specifiche scritte da Illumina per questo prodotto, in vigore alla data di spedizione del prodotto medesimo da parte di Illumina.

2 **Diritti per l'utilizzo a solo scopo di ricerca**. In conformità con i presenti termini e condizioni e se non altrimenti concordato per iscritto da un funzionario Illumina, all'acquirente viene concesso esclusivamente un diritto non esclusivo, non trasferibile, personale, che non può essere fatto oggetto di sublicenza, ai sensi della PI base Illumina, esistente alla data di spedizione di questo prodotto da parte di Illumina, a utilizzare unicamente questo prodotto presso l'impianto dell'acquirente a scopo di ricerca interna (il che comprende i servizi di ricerca forniti a terzi) e unicamente in conformità con la documentazione di questo prodotto, **ma escludendo espressamente qualsiasi uso che** (a) richiederebbe diritti o una licenza da parte di Illumina per PI per applicazioni specifiche, (b) costituisca riutilizzo di un materiale di consumo utilizzato in precedenza, (c) costituisca disassemblaggio, reverse engineering, reverse compiling o reverse assembling di questo prodotto, (d) costituisca separazione, estrazione o isolamento dei componenti di questo prodotto o altra analisi non autorizzata del medesimo, (e) determini l'accesso o individui le modalità di funzionamento di questo prodotto, (f) costituisca utilizzo di reagenti/materiali di consumo non forniti da Illumina con l'hardware del medesimo (non applicabile se le specifiche o la documentazione indicano altrimenti) o (g) costituisce cessione a terzi o sublicenza del software, o di qualsiasi software di terzi. Il software, che venga fornito separatamente, installato o incorporato in un prodotto, viene concesso in licenza all'acquirente e non venduto. A eccezione di quanto espressamente indicato nella presente sezione, nessun diritto o licenza sui diritti di proprietà intellettuale di Illumina viene concessa, espressamente, implicitamente o in base al principio di inopponibilità.

È esclusiva responsabilità dell'acquirente assicurarsi di disporre di tutti i diritti di proprietà intellettuale necessari per gli usi che intende fare di questo prodotto compresi, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, diritti da terzi o diritti sulla PI per applicazioni specifiche. Illumina non garantisce in alcun modo che gli usi

specifici previsti dall'acquirente non violino i diritti di proprietà intellettuale di terzi o la PI per applicazioni specifiche.

3 **Disposizioni normative**. Questo prodotto non è stato autorizzato o approvato da parte della FDA statunitense o di qualsiasi altro ente normativo nazionale o estero per qualsiasi uso specifico, di ricerca, commerciale, diagnostico o diverso. Questo prodotto è etichettato "Solo per l'utilizzo a scopo di ricerca". L'acquirente deve assicurarsi di disporre delle eventuali autorizzazioni di legge necessarie per gli usi previsti di questo prodotto.

4 **Utilizzi non autorizzati**. L'acquirente accetta quanto segue: (a) di utilizzare ogni materiale di consumo solo una volta e (b) di utilizzare esclusivamente materiali di consumo/reagenti Illumina in combinazione con l'hardware Illumina. Le limitazioni di cui ai punti (a)-(b) non si applicano se la documentazione o le specifiche di questo prodotto indicano altrimenti. L'acquirente concorda di non intraprendere alcuna delle seguenti attività e di non autorizzare terzi a farlo: (i) disassemblare, eseguire il reverse engineering, il reverse compiling o il reverse assembling di questo prodotto, (ii) separare, estrarre o isolare componenti di questo prodotto o sottoporre questo prodotto o suoi componenti a qualsiasi analisi non espressamente autorizzata nella documentazione di questo prodotto, (iii) ottenere l'accesso o tentare di determinare le modalità di funzionamento di questo prodotto o (iv) trasferire a terzi, o concedere in sublicenza, qualsiasi software come sopra definito, o qualsiasi software di terze parti. L'acquirente accetta inoltre che il contenuto e le modalità di funzionamento di questo prodotto sono di proprietà di Illumina e che questo prodotto include o incorpora segreti commerciali di Illumina. Le condizioni e le limitazioni incluse nei presenti termini e condizioni sono condizioni di vendita negoziate e, conseguentemente, controllano la vendita e l'utilizzo di questo prodotti da parte dell'acquirente.

5 **Limitazione di responsabilità. NEI LIMITI CONSENTITI DALLA LEGGE, IN NESSUN CASO ILLUMINA O I SUOI FORNITORI POTRANNO ESSERE RITENUTI RESPONSABILI NEI CONFRONTI DELL'ACQUIRENTE O DI TERZI PER COSTI DI ACQUISIZIONE DI PRODOTTI O SERVIZI SOSTITUTIVI, LUCRO CESSANTE, PERDITA DI DATI O OPPORTUNITÀ COMMERCIALI, O PER DANNI INDIRETTI, SPECIALI, ACCIDENTALI, ESEMPLARI, CONSEGUENTI O PUNITIVI DI QUALSIASI TIPO DERIVANTI O COLLEGATI, A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO, CON LA VENDITA DI QUESTO PRODOTTO, IL SUO UTILIZZO, L'ADEMPIMENTO DI ILLUMINA AI SENSI DELLA PRESENTE O CON UNO O PIÙ DEI PRESENTI TERMINI E CONDIZIONI, QUALUNQUE NE SIA LA DERIVAZIONE O LA CAUSA E INDIPENDENTEMENTE DAL TITOLO DI RESPONSABILITÀ (CONTRATTUALE, PER ILLECITO (INCLUSA LA NEGLIGENZA), RESPONSABILITÀ OGGETTIVA O ALTRO).**

6 **LA RESPONSABILITÀ TOTALE E COMPLESSIVA DI ILLUMINA NEI CONFRONTI DELL'ACQUIRENTE O DI TERZI, DERIVANTE O IN CONNESSIONE CON I PRESENTI TERMINI E CONDIZIONI INCLUSI, A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO, QUESTO PRODOTTO (E IL SUO UTILIZZO) E L'ADEMPIMENTO DI ILLUMINA AI SENSI DELLA PRESENTE, A TITOLO DI RESPONSABILITÀ CONTRATTUALE, ILLECITO (INCLUSA LA NEGLIGENZA), RESPONSABILITÀ OGGETTIVA O ALTRO, IN NESSUN CASO POTRÀ SUPERARE L'IMPORTO CORRISPOSTO A ILLUMINA PER QUESTO PRODOTTO.**

7 **Limitazioni sulle garanzie fornite da Illumina. NEI LIMITI CONSENTITI DALLA LEGGE E IN CONFORMITÀ CON LA GARANZIA ESPLICITA DEL PRODOTTO PREVISTA DAI PRESENTI TERMINI E CONDIZIONI, ILLUMINA NON FORNISCE (ED ESCLUDE ESPRESSAMENTE) QUALSIASI GARANZIA, ESPLICITA, IMPLICITA O DI LEGGE, IN RELAZIONE A QUESTO PRODOTTO COMPRESE, A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO, GARANZIE IMPLICITE DI COMMERCIABILITÀ, IDONEITÀ PER UN SCOPO SPECIFICO, NON VIOLAZIONE DI DIRITTI ALTRUI, O DERIVANTI DA ADEMPIMENTO, RAPPORTI COMMERCIALI, UTILIZZO O ATTIVITÀ COMMERCIALE. SENZA LIMITAZIONE DELLA GENERALITÀ DI QUANTO SOPRA, ILLUMINA ESCLUDE QUALSIASI DICHIARAZIONE O GARANZIA DI QUALSIVOGLIA TIPO IN RELAZIONE ALL'UTILITÀ DI QUESTO PRODOTTO PER L'IMPIEGO DA PARTE DELL'ACQUIRENTE.**

8 **Garanzia sul prodotto**. Tutte le garanzie sono personali per l'acquirente e non possono essere trasferite o cedute a terzi, inclusi affiliati dell'acquirente medesimo. Tutte le garanzie sono relative a impianti specifici e non vengono trasferite in caso di spostamento del prodotto ad altro impianto dell'acquirente, a meno che non sia Illumina a predisporre tale spostamento.

a **Garanzia sui materiali di consumo**. Illumina garantisce che i materiali di consumo, diversi da quelli personalizzati, saranno conformi alle relative specifiche, fino a (i) 3 mesi dalla data di spedizione da parte di Illumina o (ii) fino alla data di scadenza o al termine del periodo di validità indicato sul materiale di consumo da Illumina, se successivo; ma in ogni caso non oltre 12 mesi dalla data di spedizione. Per quanto riguarda i materiali di consumo personalizzati (vale a dire, confezionati in base a specifiche o indicazioni dell'acquirente o forniti a Illumina da o per conto dell'acquirente), Illumina garantisce esclusivamente che i materiali di consumo personalizzati saranno prodotti e testati in conformità con i processi standard di controllo qualità e produzione di Illumina. Illumina non garantisce che i materiali consumabili personalizzati funzioneranno come previsto dall'acquirente o per gli usi da lui previsti.

b **Garanzia sull'hardware**. Illumina garantisce che l'hardware, diverso dai componenti aggiornati, sarà conforme alle relative specifiche, per un periodo di 12 mesi dalla data di spedizione da parte di Illumina, a meno che non includa l'installazione a opera di Illumina: in tal caso, il periodo di garanzia decorrerà dalla data di installazione o dal 30° giorno successivo alla data di consegna, se precedente (di seguito la "Garanzia hardware base"). Per "componenti aggiornati" si intendono componenti, modifiche o miglioramenti apportati da Illumina all'hardware precedentemente acquisito dall'acquirente. Illumina garantisce che i componenti aggiornati saranno conformi alle relative specifiche per un periodo di 90 giorni dalla data di installazione I componenti aggiornati non estendono la garanzia dell'hardware, a meno che l'aggiornamento non sia stato eseguito da illumina presso i propri stabilimenti, nel qual caso all'hardware aggiornato spedito all'acquirente si applicherà la garanzia hardware di base.

c **Esclusioni dalla garanzia**. Le garanzie di cui sopra non si applicano qualora la mancata conformità sia dovuta a: (i) abuso, uso improprio, negligenza, colpa, incidente, conservazione inadeguata o uso contrario alla documentazione o alle specifiche, (ii) movimentazione, installazione, manutenzione o riparazione impropria (a meno che eseguita da personale Illumina), (iii) modifiche non autorizzate, (iv) eventi di forza maggiore o (v) utilizzo con un articolo di terzi non fornito da Illumina (a meno che la documentazione o le specifiche del prodotto indichino espressamente tale articolo come adatto per l'utilizzo con il prodotto).

d **Procedure per l'applicazione della garanzia**. A scopo di idoneità in relazione alla riparazione o alla sostituzione in garanzia, l'acquirente deve (i) rivolgersi prontamente al Servizio assistenza Illumina per segnalare la non conformità, (ii) fornire la propria collaborazione a Illumina allo scopo di confermare o diagnosticare la non conformità e (iii) restituire questo prodotto a Illumina, anticipando le spese di trasporto, in base alle istruzioni di Illumina o, se concordato tra le parti, consentire al riparatore autorizzato di Illumina di accedere al prodotto, al fine di confermare la non conformità e procedere alla riparazione.

e **Esclusività della tutela in garanzia**. Illumina provvederà, a sua discrezione, a riparare o a sostituire il prodotto non conforme del quale abbia confermato la copertura in garanzia. Ai materiali di consumo riparati o sostituiti si applica una garanzia di 30 giorni. L'hardware può essere riparato o sostituito con hardware o componenti funzionalmente equivalenti, ricondizionati o nuovi (anche se solo un solo componente dell'hardware sia non conforme). Qualora l'hardware venga sostituito interamente, il periodo di garanzia per la sostituzione è il periodo più breve tra i 90 giorni successivi alla data di spedizione e la durata restante della garanzia hardware originale. Qualora venga sostituito o riparato unicamente un componente, il periodo di garanzia per il suddetto componente è il periodo che termini più tardi tra i 90 giorni successivi alla data di spedizione e la durata restante della garanzia hardware originale. Quanto sopra esaurisce i mezzi di tutela a disposizione dell'acquirente e gli obblighi di Illumina ai sensi della garanzia qui prevista.

f **Articoli di terzi e garanzia**. Illumina non ha alcun obbligo di garanzia in relazione a qualsiasi articolo proveniente da terzi e fornito all'acquirente ai sensi della presente. Sono articoli di terzi quelli riportanti marchio o etichetta con il nome di un terzo. L'eventuale garanzia per gli articoli di terzi è fornita dal produttore originale. Previa richiesta scritta, Illumina tenterà di passare eventuali garanzie di tale tipo all'acquirente.

9 **Indennizzo**.

a **Indennizzo per violazione di diritti di terzi da parte di Illumina**. In conformità ai presenti termini e condizioni comprese, a titolo esemplificato ma non esaustivo, le esclusioni agli obblighi di indennizzo di Illumina (sezione 9(b) di seguito) e le condizioni degli obblighi di indennizzo (sezione 9(d) di seguito), Illumina sarà tenuto (i) a difendere, manlevare e tenere l'acquirente indenne da ogni pretesa o azione di terzi basata sulla presunta violazione di diritti di proprietà intellettuale validi e applicabili di terzi da parte di questo prodotto, quando utilizzato a scopi di ricerca, in conformità con i presenti termini e condizioni, e in conformità con la documentazione e le specifiche relative e (ii) a sostenere i costi di qualsivoglia transazione, sentenza definitiva e spesa (comprese le ragionevoli spese legali) che l'acquirente debba sostenere in relazione a tale pretesa violazione. Qualora questo prodotto o parte di esso divenga o possa diventare secondo l'opinione di Illumina, oggetto di azione per violazione di diritti di terzi, sarà facoltà di Illumina, a sua discrezione: (A) di procurare all'acquirente il diritto di continuare a utilizzare questo prodotto, (B) di modificare o sostituire questo prodotto con un sostituto sostanzialmente equivalente che non configuri violazione o (C) di richiedere la restituzione di questo prodotto e porre fine ai diritti, alla licenza e a ogni altra autorizzazione fornita all'acquirente in relazione a esso, nonché a rimborsare all'acquirente il valore (come indicato nei documenti ufficiali dell'acquirente) del prodotto restituito, tenendo conto dell'ammortamento maturato al momento della restituzione; considerando che nessun rimborso verrà effettuato per i materiali di consumo usati o scaduti. La presente sezione esaurisce la responsabilità di Illumina per qualsiasi violazione di diritti di proprietà intellettuale di terzi.

b **Esclusioni agli obblighi di indennizzo di Illumina**. Illumina ha l'obbligo di difendere, indennizzare e tenere indenne l'acquirente da qualsiasi pretesa violazione di diritti di terzi da parte di Illumina, nella misura in cui essa derivi da: (i) l'utilizzo di questo prodotto in qualsiasi modo o per qualsiasi scopo non compreso nell'ambito dell'utilizzo per scopi di ricerca, (ii) l'utilizzo di questo prodotto in modo non conforme alle sue caratteristiche tecniche, alla documentazione, ai diritti espressamente concessi all'acquirente nell'ambito della presente o in violazione, da parte dell'acquirente, dei presenti termini e condizioni, (iii) l'utilizzo di questo prodotto in combinazione con altri prodotti, materiali o servizi non forniti da Illumina, (iv) l'utilizzo di questo prodotto per eseguire saggi o altri processi non forniti da Illumina o (v) la conformità di Illumina con specifiche o istruzioni per questo prodotto fornite da o per conto dell'acquirente (ciascuno dei punti da (i) a (v) viene di seguito definito come una "Pretesa oggetto di esclusione").

c **Indennizzo da parte dell'acquirente**. L'acquirente dovrà difendere, manlevare e tenere indenne Illumina, i suoi affiliati, i loro collaboratori non affiliati e partner di sviluppo che abbiano contribuito allo sviluppo di questo prodotto, nonché i rispettivi funzionari, dirigenti, rappresentanti e dipendenti, da qualsiasi pretesa, responsabilità, danno, multa, penale, azione legale e perdita di ogni e qualsivoglia tipo comprese, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, azioni per danni a persone o decesso, e violazioni di diritti di proprietà intellettuale di terzi, derivanti, relativi o che siano originati da (i) violazione da parte dell'acquirente di uno dei presenti termini e condizioni, (ii) utilizzo di questo prodotto da parte dell'acquirente al di fuori dell'ambito di utilizzo per scopi di ricerca, (iii) qualsiasi utilizzo di questo prodotto non conforme alle specifiche o alla documentazione relativa o (iv) qualsiasi pretesa oggetto di esclusione.

d **Condizioni degli obblighi di indennizzo**. Gli obblighi di indennizzo delle parti sono condizionali al fatto che la parte che richiede l'indennizzo (i) informi tempestivamente la controparte, in forma scritta, della pretesa o dell'azione relativa, (ii) conferisca alla controparte controllo e autorità esclusivi in relazione alla difesa e alla transazione di tale pretesa o azione, (iii) non ammetta la violazione di qualsivoglia diritto di proprietà intellettuale altrui senza il preventivo consenso scritto della controparte, (iv) non concluda alcuna transazione o compromesso relativo a qualsivoglia pretesa o azione senza il preventivo consenso scritto della controparte e infine (v) fornisca ragionevole assistenza alla controparte nella difesa della pretesa o azione; a condizione che la parte indennizzata venga rimborsata dalla controparte per le ragionevoli spese effettivamente sostenute per fornire tale assistenza.

e **Articoli di terzi e indennizzo**. Illumina non ha alcun obbligo di indennizzo in relazione a qualsiasi articolo proveniente da terzi e fornito all'acquirente. Sono articoli di terzi quelli riportanti marchio o etichetta con il nome di

un terzo. Gli eventuali diritti di indennizzo dell'acquirente in relazione ad articoli di terzi saranno quelli previsti ai sensi degli obblighi di indennizzo del produttore o del licenziante originale. Previa richiesta scritta, Illumina tenterà di passare eventuali garanzie di tale tipo all'acquirente.

Cronologia revisioni

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15023355_ITA	K	Maggio 2013	Sostituiti i reagenti seguenti: • RMR per RMX
15023355	J	Gennaio 2013	Correzione errori; rimosse le informazioni relative al sistema 1500 nelle sezioni Esecuzione di una corsa di sequenziamento. (Disponibile solo in inglese)
15023355	H	Novembre 2012	Rivisto per supportare HCS 2.0. (Disponibile solo in inglese)
15023355	G	Luglio 2012	Elencati i requisiti dei primer per le librerie TruSeq HT e per le librerie Nextera. Aggiunto un elenco di librerie a doppia indicizzazione supportate. Aggiornate le impostazioni della corsa per le librerie a doppia indicizzazione per specificare TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box indipendentemente dai primer di sequenziamento usati per la corsa. (Disponibile solo in inglese)

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15023355	F	Aprile 2012	Modificato il flusso di lavoro per l'impostazione della corsa: le guarnizioni dei collettori devono essere sostituite prima di eseguire un lavaggio di manutenzione dello strumento invece che prima di caricare la cella a flusso con cluster. Aggiunte le informazioni seguenti: • Panoramiche delle corse di sequenziamento a singola indicizzazione e a doppia indicizzazione • Descrizione delle librerie a doppia indicizzazione • Esempio di volumi di ICB per le corse a doppia indicizzazione • Istruzioni per la preparazione dei reagenti SBS, bidirezionali e di indicizzazione, inclusi i primer di sequenziamento richiesti per le librerie a doppia indicizzazione • Enfatizzato l'uso della versione corretta di TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box in base al tipo di cella a flusso (Disponibile solo in inglese)
15023355	E	Ottobre 2011	Corrette le informazioni seguenti: • Durata approssimativa della corsa per corse non indicizzate • Numero di kit richiesti per corse a doppia indicizzazione, incluso il numero massimo di cicli eseguiti con un kit da 200 cicli • Istruzioni per la separazione ICB per corse bidirezionali a doppia indicizzazione • Requisiti per un foglio campioni valido • Volumi di HP3 per corse indicizzate (Disponibile solo in inglese)
15023355	D	Ottobre 2011	Aggiornate le descrizioni software a HCS v1.5. Aggiunte le istruzioni per impostare ed eseguire corse a doppia indicizzazione per le librerie Nextera. (Disponibile solo in inglese)

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15023355	C	Giugno 2011	Aggiunte le istruzioni per caricare 25 ml di acqua da laboratorio alla posizione SBS 2 per il risciacquo automatico post-corsa. (Disponibile solo in inglese)
15023355	B	Aprile 2011	Aggiornate le descrizioni software a HCS v1.4. Aggiunte le informazioni seguenti: • Descrizione per la verifica dell'orientamento della cella a flusso • Durate approssimative delle corse per HCS v1.4 • Compatibilità della versione software e delle versioni dei kit di reagenti per diversi tipi di cella a flusso • Informazioni relative ai reagenti contenuti nel kit TruSeq SBS v3, inclusa la descrizione del flusso di lavoro alternativo per SBS v3 per il caricamento dei reagenti • Istruzioni per porre lo strumento nello stato inattivo (idling) Aggiornate le informazioni seguenti: • Posizioni dei reagenti con i nomi dei reagenti SBS v.3 • Istruzioni per spegnere lo strumento • Aumentata la quantità d'acqua richiesta per il lavaggio di manutenzione dello strumento (Disponibile solo in inglese)
15023355	A	Marzo 2011	Versione iniziale. (Disponibile solo in inglese)

Sommario

Cronologia revisioni viii
Sommario xi

Capitolo 1 Descrizione generale 1

Introduzione 2
Configurazione e componenti di HiSeq 4
Panoramica sequenziamento a singola indicizzazione 11
Panoramica sequenziamento a doppia indicizzazione 13
Materiali di consumo per il sequenziamento 17
Materiali di consumo forniti dall'utente 22
Avvio del sistema HiSeq 23

Capitolo 2 Software HiSeq 25

Introduzione 26
Interfaccia del Software di controllo HiSeq 28
Schermate configurazione corsa 34
Schermate impostazioni pre-corsa 46
Schermate di avvio della corsa 50
Schermata Run Overview (Panoramica corsa) 53
Arresto e riavvio di una corsa 56
Sospensione (pausing) di una corsa 60
Cartelle delle corse 62
Panoramica sul foglio campioni 64
Spazio disponibile sul disco 66

Capitolo 3 Esecuzione di una corsa di sequenziamento (Output elevato) 67

Introduzione 68
Flusso di lavoro del sequenziamento (Output elevato) 70
Preparazione dei reagenti SBS 73
Preparazione dei reagenti per l'indicizzazione 79
Inserimento dei parametri della corsa 84
Caricamento e priming dei reagenti 88
Caricamento di una cella a flusso 98
Monitoraggio di una corsa 104

Preparazione dei reagenti per la Lettura 2 106
Caricamento reagenti per la Lettura 2 111

Capitolo 4 Procedure post-corsa 115

Introduzione 116
Rimozione e pesatura dei reagenti 117
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione dello strumento 118
Esecuzione di un lavaggio con acqua 122
Porre lo strumento nello stato inattivo (idling) 124
Spegnimento dello strumento 125

Capitolo 5 Analisi in tempo reale (RTA) 127

Panoramica dell'Analisi in tempo reale (RTA) 128
Monitoraggio delle statistiche di durata della corsa 130
Dati di output dell'Analisi in tempo reale (RTA) 132

Capitolo 6 Risoluzione dei problemi 139

Introduzione 140
Possibili problemi d'impostazione della corsa 141
Esecuzione di una verifica della fluidica 142
Ripetizione dell'ibridazione primer Lettura 2 143
Se BaseSpace non è disponibile 144

Indice 145

Assistenza tecnica 149

Descrizione generale

Capitolo 1

Introduzione 2
Configurazione e componenti di HiSeq 4
Panoramica sequenziamento a singola indicizzazione 11
Panoramica sequenziamento a doppia indicizzazione 13
Materiali di consumo per il sequenziamento 17
Materiali di consumo forniti dall'utente 22
Avvio del sistema HiSeq 23

Introduzione

Il sistema HiSeq® Illumina unisce una progettazione innovativa e la consolidata tecnologia SBS definendo nuovi standard di output, semplicità ed efficacia in termini di costi.

HiSeq presenta le seguenti caratteristiche:

- **Imaging a doppia superficie**: HiSeq utilizza un sistema a epifluorescenza a quattro videocamere con tecnologia di scansione all'avanguardia per consentire l'imaging a doppia superficie.
- **Ampio vano refrigerato per i reagenti**: lo scomparto dei reagenti è un ampio vano refrigerato che contiene reagenti sufficienti per l'intera corsa di sequenziamento.
- **Fluidica integrata per corse bidirezionali**: la fluidica integrata bidirezionale fornisce i reagenti dallo scomparto dei reagenti alla cella a flusso per la risintesi Lettura 2 e per il sequenziamento indicizzato.
- **Opzioni dei controlli dell'interfaccia**: l'interfaccia software dello strumento fornisce varie opzioni per l'impostazione della corsa e per il funzionamento dello strumento utilizzando il monitor touch screen o la tastiera integrata.
- **Connettività BaseSpace**: il Sistema HiSeq dispone ora di un'opzione per inviare i dati relativi al sequenziamento e alla salute dello strumento tramite la soluzione genomica sul cloud di BaseSpace in tempo reale per semplificare il controllo della qualità e l'analisi dello strumento. Il monitoraggio in tempo reale delle corse da qualunque luogo, inclusa l'assistenza tecnica Illumina, velocizza la risoluzione dei problemi. BaseSpace facilita la collaborazione permettendo la condivisione istantanea dei risultati con chiunque in qualunque parte del mondo. L'allineamento e l'identificazione di varianti gratuiti e l'application store BaseSpace, forniscono flussi di lavoro di facile utilizzo per analisi personalizzate per diverse applicazioni biologiche.

Destinatari e scopo

La presente guida contiene informazioni sul sistema HiSeq e fornisce una panoramica sulle caratteristiche dei componenti e del software dello strumento e istruzioni complete per eseguire una corsa di sequenziamento.

Questa guida è destinata al personale di laboratorio e agli individui responsabili di:

- Utilizzare lo strumento
- Eseguire corse di sequenziamento
- Eseguire la manutenzione dello strumento e dei componenti
- Addestrare personale sullo strumento

Configurazione e componenti di HiSeq

Configurazione del sistema

HiSeq è consegnato con un computer dedicato personalizzato con i più recenti requisiti di sistema. Il computer è un sotto sistema dedicato dello strumento e non è da utilizzarsi né è supportato come un computer per uso generico.

Il sistema HiSeq comprende lo strumento HiSeq che include un monitor, un computer dedicato personalizzato con i più recenti requisiti di sistema, uno scanner per codici a barre, una tastiera, un mouse e un alimentatore universale.

Componenti

- **Scomparto dei reagenti**: accoglie i rack che contengono i reagenti per le corse di sequenziamento o soluzioni di lavaggio per i lavaggi dello strumento.
- **Scomparto della cella a flusso**: contiene il piano della cella a flusso a depressione, che tiene in posizione la cella a flusso durante le corse di sequenziamento.
- **Scomparto della fluidica**: contiene le pompe della fluidica che erogano i reagenti alla cella a flusso e poi al flacone degli scarti.
- **Modulo ottica integrato**: contiene componenti ottici che consentono l'imaging a doppia superficie della cella a flusso, per l'acquisizione contemporanea di A, C, G e T mediante epifluorescenza. Il fascio di luce del laser di eccitazione passa attraverso l'obiettivo e la fluorescenza viene raccolta attraverso lo stesso obiettivo.
- **Barra di stato**: utilizza tre colori per indicare lo stato dello strumento. Il blu indica che lo strumento è in esecuzione, l'arancione indica che lo strumento necessita attenzione e il verde indica che lo strumento è pronto a iniziare la corsa successiva.

Figura 1 Scomparti principali del sistema HiSeq 1000

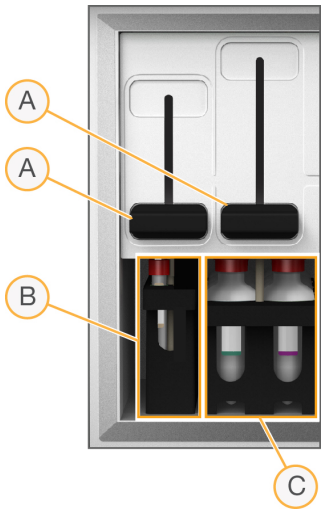
A Modulo ottica
B Scomparto della cella a flusso
C Scomparto della fluidica
D Barra di stato
E Scomparto dei reagenti

Per impostare una corsa di sequenziamento nel sistema HiSeq, è necessario accedere allo scomparto dei reagenti e a quello della cella a flusso.

Scomparto dei reagenti

Lo scomparto dei reagenti è un ampio vano refrigerato per i reagenti che contiene due rack reagenti: uno per i reagenti SBS e uno per i reagenti bidirezionali (paired-end). Le maniglie dei pettini di aspirazione abbassano i pescanti nei flaconi di reagente in ciascun rack.

Figura 2 Scomparto dei reagenti



A Maniglie
B Rack per reagenti bidirezionali o per l'indicizzazione
C Rack reagenti SBS

- **Rack reagenti SBS**: il rack reagenti SBS, posizionato all'estrema destra, contengono flaconi conici da 250 ml. Il rack reagenti dispone di posizioni numerate che corrispondono ai collegamenti sulla pompa della fluidica.
- **Rack reagenti bidirezionali**: il rack reagenti bidirezionali, che si trova a sinistra rispetto al rack SBS, contiene provette coniche da 15 ml contenenti i reagenti bidirezionali e i reagenti per l'indicizzazione.
- **Vano refrigerato per i reagenti**: è progettato per mantenere i reagenti a una temperatura di 4 °C. Questo vano refrigerato non è pensato per il raffreddamento dei reagenti. Pertanto i reagenti devono essere raffreddati prima di essere caricati sullo strumento.

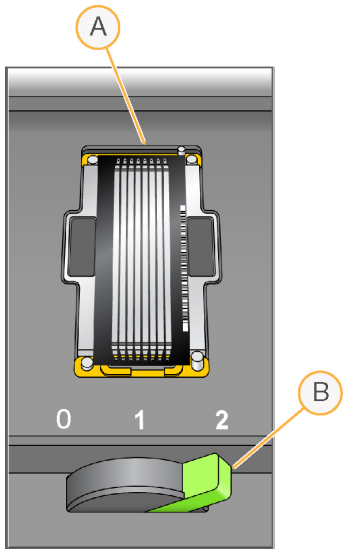
Scomparto della cella a flusso

Lo scomparto della cella a flusso contiene il piano portacelle, la stazione termica, la pompa a vuoto e le connessioni della fluidica alla cella a flusso.

La cella a flusso è posizionata sul piano portacelle, che si sposta dentro e fuori il modulo ottica. La cella a flusso è posizionata nel vano portacella con le porte di ingresso e di

uscita rivolte verso il basso ed è tenuta in posizione da una pompa a vuoto. La pompa a vuoto è controllata da una leva illuminata davanti al vano portacella. La leva della cella a flusso diventa verde quando la pompa a vuoto è posizionata correttamente.

Figura 3 Piano portacelle



A Cella a flusso
B Leva della cella a flusso

Fusibili

Solo i tecnici di assistenza (FSE) Illumina sono qualificati per la sostituzione dei fusibili interni. Il modulo di ingresso alimentazione include due fusibili di ingresso sulle linee di ingresso ad alta tensione. Questi fusibili sono della dimensione 5 mm x 20 mm e sono del tipo 10 A, 250 V c.a, slow blow.

Cavi di alimentazione

HiSeq è dotato di un connettore con standard internazionale IEC 60320 C13 e fornito con un cavo di alimentazione specifico per il paese.

Le tensioni pericolose sono rimosse dallo strumento solo quando il cavo di alimentazione è scollegato dalla fonte di alimentazione c.a.

Per ottenere connettori equivalenti o cavi di alimentazione conformi agli standard locali, consultare un fornitore di terze parti come Interpower Corporation (www.interpower.com).

ATTENZIONE
Non utilizzare mai una prolunga per collegare lo strumento alla fonte di alimentazione.

Uscita calore

Di seguito è mostrata la dissipazione termica per uno strumento HiSeq con computer (PC) e monitor.

Tabella 1 Dissipazione termica per strumento

Componente	Potenza misurata (Watt)	Uscita termica (Btu/h)
Strumento	750	2,600
PC e monitor	750	1,400
Totale per strumento, PC e monitor	1,500	4,000

ATTENZIONE
Non operare HiSeq se un qualsiasi pannello è rimosso. Non toccare la stazione termica nello scomparto di imaging. Il riscaldatore a effetto Peltier utilizzato nell'area del piano è di solito controllata tra la temperatura ambiente (22 °C) e 85 °C. L'esposizione a temperature al limite superiore di questo range potrebbero causare bruciature.

Radiazioni laser

HiSeq è un dispositivo laser di Classe 1 che contiene due laser di Classe 4.

I laser di Classe 4 presentano un pericolo per gli occhi a causa dei riflessi dei fasci di luce diretti e diffusi. Evitare l'esposizione diretta o riflessa alle radiazioni dei laser di Classe 4 su occhi o pelle. I laser di Classe 4 possono causare la combustione di materiale infiammabile e provocare bruciature o lesioni serie alla pelle causate dall'esposizione diretta.

Non operare lo strumento se un qualsiasi pannello è rimosso. Quando lo sportello anteriore dello strumento è aperto, il raggio laser è bloccato tramite interruttori di

interblocco di protezione. Se lo strumento viene fatto funzionare con un qualsiasi pannello rimosso, si rischia l'esposizione diretta o riflessa alla luce del laser.

Figura 4 Avvertenza per il laser di Classe 4

Precauzioni per il laser dello scanner per codice a barre

Con il sistema di sequenziamento HiSeq è incluso uno scanner per codice a barre manuale che contiene un laser di Classe 2. Lo scanner per codice a barre è un prodotto laser di Classe 2. Non fissare il fascio di luce visibile dello scanner per codice a barre.

Marchi di conformità e normativi

Lo strumento HiSeq è etichettato con i seguenti marchi di conformità e normativi.

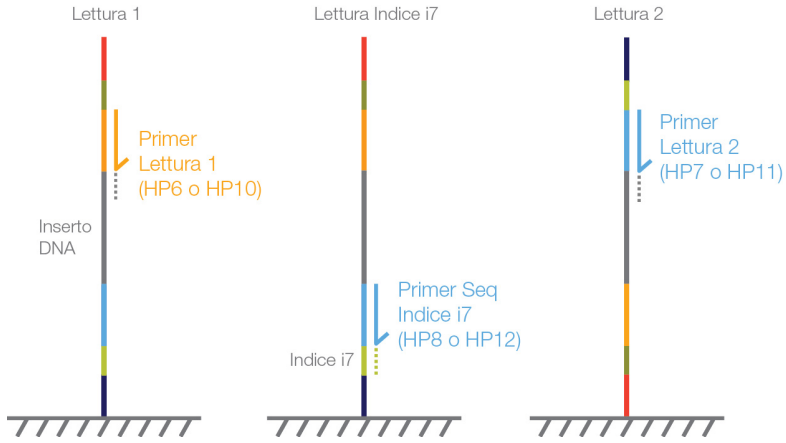
Marchio	Significato
CE	Questa etichetta assicura che il prodotto è conforme ai requisiti di tutte le direttive UE rilevanti.
10	Questa etichetta assicura che il prodotto è conforme ai requisiti della normativa cinese ROHS.

Marchio	Significato
	Questa etichetta assicura che il prodotto è conforme agli standard di sicurezza e che è stato testato e certificato da un'organizzazione di terzi.
	Questa etichetta assicura che il prodotto è conforme alle direttive RAEE relative ai rifiuti. Per lo smaltimento, restituire lo strumento a Illumina.

Panoramica sequenziamento a singola indicizzazione

Il sequenziamento a singola indicizzazione include una Lettura Indici dopo la Lettura 1.

Figura 5 Sequenziamento a singola indicizzazione



Lettura 1

La Lettura 1 segue il protocollo standard di sequenziamento Lettura 1 utilizzando reagenti forniti nel kit TruSeq SBS. Il primer di sequenziamento Lettura 1 viene appaiato (annealing) al filamento stampo durante il processo di generazione dei cluster su cBot.

- Nel caso di sequenziamento di librerie Nextera a doppia indicizzazione, si deve obbligatoriamente utilizzare il primer di sequenziamento fornito nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, **HP10**, che è utilizzato su cBot al posto di HP6. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente di cBot*, n. codice 15006165_ITA.
- Nel caso di sequenziamento di librerie TruSeq LT/v2 a singola indicizzazione o di librerie TruSeq HT a doppia indicizzazione, si può utilizzare HP6 o HP10.

Preparazione Lettura indici

Il prodotto Lettura 1 viene rimosso e il primer di sequenziamento per l'Indice 1 (i7) viene appaiato (annealing) allo stesso filamento stampo, consentendo la Lettura Indice 1 (i7).

- Nel caso di sequenziamento a doppia indicizzazione, si deve obbligatoriamente utilizzare il primer di sequenziamento fornito nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, **HP12**, che è utilizzato su cBot al posto di HP8.
- Nel caso di sequenziamento di librerie TruSeq LT/v2 a singola indicizzazione o di librerie TruSeq HT a doppia indicizzazione, si può utilizzare HP8 o HP12.

Lettura Indice 1 (i7)

Dopo la preparazione Lettura Indici, si esegue la Lettura Indice 1 (i7).

- Nel caso di sequenziamento di librerie a singola indicizzazione, la Lettura Indice consiste in sette cicli di sequenziamento.
- Nel caso di sequenziamento di librerie a doppia indicizzazione (Nextera o TruSeq HT), la Lettura Indice consiste in otto cicli di sequenziamento.

Risintesi Lettura 2

Il prodotto della Lettura Indice viene rimosso e il filamento stampo originale è utilizzato per rigenerare il filamento complementare. Poi, il filamento stampo originale viene rimosso per consentire l'ibridazione del primer di sequenziamento Lettura 2.

- Nel caso di sequenziamento di librerie Nextera a doppia indicizzazione, si deve obbligatoriamente utilizzare il primer di sequenziamento fornito nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, **HP11**, che è utilizzato su cBot al posto di HP7.
- Nel caso di sequenziamento di librerie TruSeq LT/v2 a singola indicizzazione o di librerie TruSeq HT a doppia indicizzazione, si può utilizzare HP7 o HP11.

Lettura 2

La Lettura 2 segue il protocollo standard di sequenziamento bidirezionale utilizzando reagenti forniti nel kit TruSeq SBS.

Panoramica sequenziamento a doppia indicizzazione

NOTA
L'esecuzione di corse di sequenziamento a doppia indicizzazione richiede il Software di controllo HiSeq (HiSeq Control Software, HCS) v1.5 o successiva.

Il sequenziamento a doppia indicizzazione include due Letture Indici dopo la Lettura 1.

Figura 6 Sequenziamento unidirezionale a doppia indicizzazione

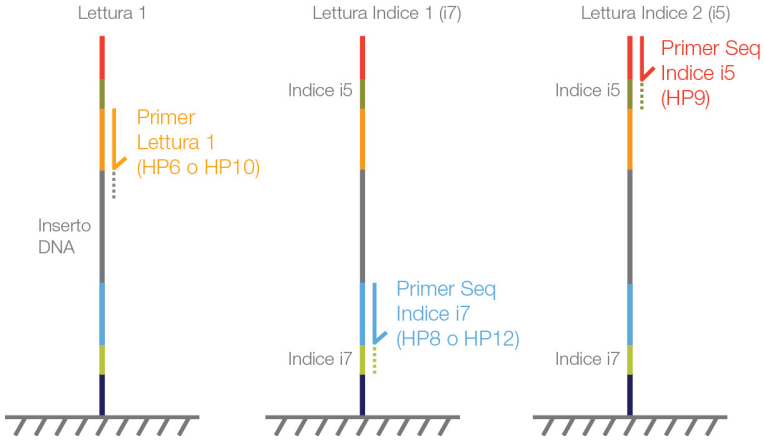
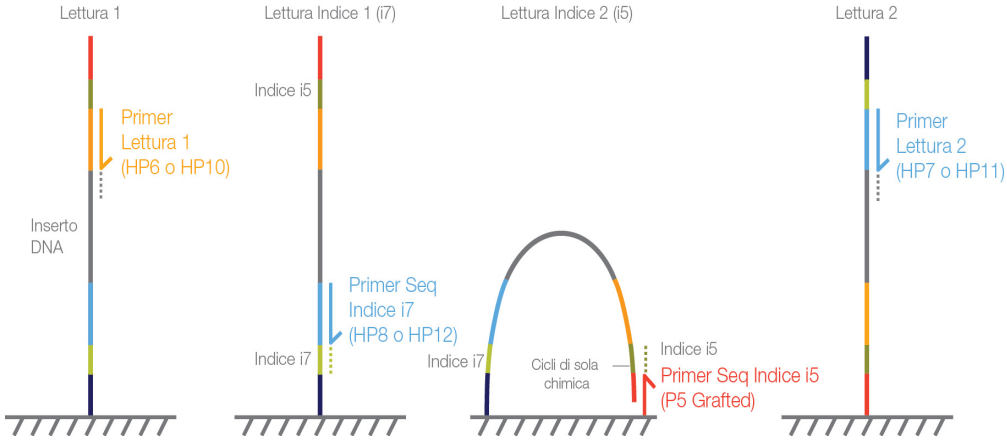


Figura 7 Sequenziamento bidirezionale a doppia indicizzazione



Lettura 1

La Lettura 1 segue il protocollo standard di sequenziamento Lettura 1 utilizzando reagenti forniti nel kit TruSeq SBS. Il primer di sequenziamento Lettura 1 viene appaiato (annealing) al filamento stampo durante il processo di generazione dei cluster su cBot.

- Nel caso di sequenziamento di librerie Nextera a doppia indicizzazione, si deve obbligatoriamente utilizzare l'appropriato primer di sequenziamento fornito nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, **HP10**, che è utilizzato su cBot al posto di HP6. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente di cBot*, n. codice 15006165_ITA.
- Nel caso di sequenziamento di librerie TruSeq HT a doppia indicizzazione, si può utilizzare HP6 oppure HP10.

Preparazione Lettura indici

Il prodotto Lettura 1 viene rimosso e il primer di sequenziamento per l'Indice 1 (i7) viene appaiato (annealing) allo stesso filamento stampo, consentendo la Lettura Indice 1 (i7).

- Nel caso di sequenziamento di librerie Nextera a doppia indicizzazione, si deve obbligatoriamente utilizzare il primer di sequenziamento fornito nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, **HP12**, che è utilizzato su cBot al posto di HP8.
- Nel caso di sequenziamento di librerie TruSeq HT a doppia indicizzazione, si può utilizzare HP8 oppure HP12.

Lettura Indice 1 (i7)

Dopo la preparazione Lettura Indici, si esegue la Lettura Indice 1 (i7). Nel caso di sequenziamento di librerie a doppia indicizzazione (Nextera o TruSeq HT), la Lettura Indice consiste in otto cicli di sequenziamento.

Lettura Indice 2 (i5)

Il processo per la Lettura Indice 2 (i5) è differente per corse eseguite su celle a flusso unidirezionali (single read) rispetto a corse eseguite su celle a flusso bidirezionali (paired-end):

- **Celle a flusso unidirezionali**: il prodotto della Lettura Indice 1 (i7) viene rimosso e la Miscela primer di sequenziamento Indice 2 (i5) [Index 2 (i5) Sequencing Primer Mix], **HP9**, è appaiata (annealing) allo stesso filamento stampo. HP9 è fornito nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box ed è necessario per le corse a

doppia indicizzazione su celle a flusso unidirezionali indipendentemente dal tipo di libreria (Nextera o TruSeq HT). La corsa procede per otto cicli di sequenziamento.

- **Celle a flusso bidirezionali**: il prodotto della Lettura Indice 1 (i7) viene rimosso. La Miscela di risintesi, **RMR**, deprotegge il primer P5 innestato sulla superficie della cella a flusso e il templato si appaia (annealing) al primer P5 innestato. La corsa procede con altri sette cicli di sola chimica (ossia senza imaging), seguiti da otto cicli di sequenziamento.

Risintesi Lettura 2

Il prodotto della Lettura Indice viene rimosso e il filamento stampo originale è utilizzato per rigenerare il filamento complementare. Poi, il filamento stampo originale viene rimosso per consentire l'ibridazione del primer di sequenziamento Lettura 2.

- Nel caso di sequenziamento di librerie Nextera a doppia indicizzazione, si deve obbligatoriamente utilizzare il primer di sequenziamento fornito nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box, **HP11**, che è utilizzato su cBot al posto di HP7.
- Nel caso di sequenziamento di librerie TruSeq HT a doppia indicizzazione, si può utilizzare HP7 oppure HP11.

Lettura 2

La Lettura 2 segue il protocollo standard di sequenziamento bidirezionale utilizzando reagenti forniti nel kit TruSeq SBS.

Librerie a doppia indicizzazione

Le librerie a doppia indicizzazione vengono preparate con adattatori contenenti due indici:

- Indice 1 (i7), un indice a otto basi adiacente al filamento P7
- Indice 2 (i5), un indice a otto basi adiacente al filamento P5

Durante la preparazione del campione, fino a 12 sequenze Indice 1 univoche sono disposte a matrice secondo le colonne di una piastra a 96 pozzetti e fino a otto sequenze Indice 2 univoche sono disposte a matrice secondo le righe, creando fino a 96 adattatori univocamente a doppio indice.

Librerie a doppia indicizzazione supportate

Sul sistema HiSeq è supportato il sequenziamento a doppia indicizzazione delle librerie preparate con i seguenti kit Illumina:

- Kit TruSeq HT Sample Prep
- Kit Nextera DNA Sample Prep
- Kit Nextera XT Sample Prep
- Kit Nextera Custom e Exome Enrichment Sample Prep

Materiali di consumo per il sequenziamento

Per il sequenziamento sul sistema HiSeq sono necessari materiali di consumo forniti da Illumina. I kit necessari dipendono dal tipo di corsa che si esegue e dal tipo di librerie che si stanno sequenziando.

Tipo di corsa	Tipo di libreria	Materiali di consumo compatibili
Tutte le corse	Qualsiasi tipo di libreria	Kit TruSeq SBS
Corsa di sequenziamento indicizzata	Qualsiasi tipo di libreria	Kit TruSeq Cluster, SR o PE
Corsa di sequenziamento bidirezionale	Qualsiasi tipo di libreria	Kit TruSeq Cluster PE
Tutti i tipi di corsa	Librerie Nextera	TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box
Corsa unidirezionale a doppia indicizzazione Cella a flusso unidirezionale	Librerie TruSeq HT	TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box

Per maggiori informazioni, vedere *Primer di sequenziamento secondo il tipo di corsa* a pagina 20.

Reagenti SBS

Il kit TruSeq SBS fornisce i reagenti di sequenziamento. Tutte le corse di sequenziamento richiedono un kit TruSeq SBS da 200 cicli, oppure uno o più kit TruSeq SBS da 50 cicli, a seconda del numero totale di cicli della corsa.

- Un kit da 200 cicli fornisce reagenti sufficienti per un massimo di 209 cicli.
- Un kit da 50 cicli fornisce reagenti sufficienti per un massimo di 58 cicli.

Kit	N. di catalogo
Kit TruSeq SBS v3 - HS (200 cicli)	N. di catalogo FC-401-3001
Kit TruSeq SBS v3 - HS (50 cicli)	N. di catalogo FC-401-3002

NOTA

Per corse di sequenziamento bidirezionali a doppia indicizzazione fino a 209 cicli totali, è sufficiente un kit SBS da 200 cicli. Per corse nelle quali il numero totale superi i 209 cicli, come corse bidirezionali a doppia indicizzazione da 101 cicli con 225 cicli totali, è possibile usare quattro kit SBS da 50 cicli. Per maggiori informazioni, vedere *Kit SBS per sequenziamento a doppia indicizzazione* a pagina 73.

Reagenti per indicizzazione

I reagenti di indicizzazione per il sequenziamento di librerie a singola indicizzazione o di librerie a doppia indicizzazione sono forniti nel Kit TruSeq Cluster (SR oppure PE). Un kit fornisce reagenti sufficienti per il sequenziamento di una cella a flusso.

Kit	N. di catalogo
Kit TruSeq SR Cluster v3 (cBot - HS)	N. di catalogo GD-401-3001
Kit TruSeq PE Cluster v3 (cBot - HS)	N. di catalogo PE-401-3001

NOTA

Per tutte le corse di sequenziamento che utilizzano librerie Nextera e per le corse a doppia indicizzazione che utilizzano librerie TruSeq HT su una cella a flusso unidirezionale, sono richiesti primer di sequenziamento addizionali per le Letture Indici. Per maggiori informazioni, vedere *Primer di sequenziamento per librerie a doppia indicizzazione* a pagina 19.

Reagenti bidirezionali

Tutte le corse di sequenziamento bidirezionali richiedono i reagenti bidirezionali forniti nel kit TruSeq PE Cluster Kit. Un kit fornisce reagenti sufficienti per il sequenziamento di una cella a flusso bidirezionale.

Kit	N. di catalogo
Kit TruSeq PE Cluster v3 (cBot - HS)	N. di catalogo PE-401-3001

NOTA

Le librerie Nextera a doppia indicizzazione richiedono il primer per sequenziamento Lettura 2 fornito nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box (Primer TruSeq per sequenziamento a doppia indicizzazione). Per maggiori informazioni, vedere *Primer di sequenziamento per librerie a doppia indicizzazione* a pagina 19.

Accessori per il sequenziamento

Il Kit TruSeq Cluster (cBot - HS) contiene un kit di accessori, che include i seguenti componenti utilizzati per impostare una corsa di sequenziamento sul sistema HiSeq.

- **ICB Instrument Tube**: un flacone da 250 ml utilizzato per la ripartizione e la preparazione dell'ICB.
- **Flow Cell Gaskets**: quattro guarnizioni per cella a flusso da installare prima di eseguire un lavaggio di manutenzione dello strumento.
- **Funnel Caps**: otto tappi a imbuto utilizzati durante il caricamento dei reagenti SBS.

Primer di sequenziamento per librerie a doppia indicizzazione

Le librerie Nextera a doppia indicizzazione e le librerie TruSeq HT a doppia indicizzazione presentano requisiti differenti per i primer di sequenziamento:

- **Librerie Nextera**: le librerie Nextera richiedono primer di sequenziamento addizionali forniti nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box. Tali primer sono utilizzati nel corso del processo di sequenziamento, inclusi la Lettura 1 (applicati durante la generazione dei cluster), qualsiasi Lettura Indice e la Lettura 2.
  - Le corse di sequenziamento su celle a flusso unidirezionali richiedono i primer di sequenziamento forniti nel kit unidirezionale.
  - Le corse di sequenziamento su celle a flusso bidirezionali richiedono i primer di sequenziamento forniti nel kit bidirezionale, anche se si prevede di eseguire corse unidirezionali su una cella a flusso bidirezionale.
- **Librerie TruSeq HT**: nel caso di sequenziamento su una cella a flusso bidirezionale, nel corso del processo di sequenziamento le librerie TruSeq HT possono utilizzare i primer di sequenziamento forniti nel kit TruSeq Cluster. Tuttavia, nel caso di esecuzione di una corsa a doppia indicizzazione su una cella a flusso unidirezionale, le librerie TruSeq HT richiedono il primer di sequenziamento Lettura Indice 2 (HP9) della confezione Dual Index Sequencing Primer Box (Single-Read).

NOTA
I primer di sequenziamento forniti nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box sono compatibili con tutte le librerie TruSeq e Nextera. Se la cella a flusso dell'utente contiene una combinazione di librerie TruSeq e Nextera in corsie differenti, utilizzare per l'intera corsa i primer di sequenziamento della confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Una confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box fornisce reagenti sufficienti per il sequenziamento di una cella a flusso.

Nome del kit	N. di catalogo
TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box (Single Read)	N. di catalogo FC-121-1003
TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box (Paired End)	N. di catalogo PE-121-1003

Contenuto confezione primer per doppia indicizzazione, unidirezionale

Nome del reagente	Conservazione	Descrizione
HP10	da -15 °C a -25 °C	Miscela primer sequenziamento Lettura 1
HP12	da -15 °C a -25 °C	Miscela primer sequenziamento Indice 1 (i7)
HP9	da -15 °C a -25 °C	Miscela primer sequenziamento Indice 2 (i5)

Contenuto confezione primer per doppia indicizzazione, bidirezionale

Nome del reagente	Conservazione	Descrizione
HP10	da -15 °C a -25 °C	Miscela primer sequenziamento Lettura 1
HP12	da -15 °C a -25 °C	Miscela primer sequenziamento Indice 1 (i7)
HP11	da -15 °C a -25 °C	Miscela primer sequenziamento Lettura 2

Primer di sequenziamento secondo il tipo di corsa

La seguente tabella elenca i primer di sequenziamento richiesti secondo il tipo di libreria e il tipo di cella a flusso.

Tipo di corsa	Lettura 1 (cBot)	Indice 1 (i7)	Indice 2 (i5)	Lettura 2
Librerie Nextera Cella a flusso unidirezionale	HP10	HP12	HP9	--

Tipo di corsa	Lettura 1 (cBot)	Indice 1 (i7)	Indice 2 (i5)	Lettura 2
Librerie Nextera Cella a flusso bidirezionale	HP10	HP12	P5 innestato sulla cella a flusso	HP11
Librerie TruSeq HT Cella a flusso unidirezionale	HP6 o HP10	HP8 o HP12	HP9	--
Librerie TruSeq HT Cella a flusso bidirezionale	HP6 o HP10	HP8 o HP12	P5 innestato sulla cella a flusso	HP7 o HP11
Librerie TruSeq LT/v2 Cella a flusso unidirezionale o Cella a flusso bidirezionale	HP6 o HP10	HP8 o HP12	--	HP7 o HP11
Librerie TruSeq Small RNA Cella a flusso unidirezionale o Cella a flusso bidirezionale	HP6 o HP10	HP8 o HP12	--	HP7 o HP11

NOTA

Le librerie TruSeq HT sono librerie a doppia indicizzazione. Le librerie TruSeq LT sono librerie a singola indicizzazione e includono librerie preparate con kit TruSeq v2.

Compatibilità versione e requisiti

Per prestazioni e risultati ottimali della corsa, usare sempre versioni compatibili dei materiali di consumo di sequenziamento e del software.

Tipo di corsa	Software di controllo HiSeq
Sequenziamento a doppia indicizzazione	HCS v1.5 o successiva

Versione del kit di reagenti	Software di controllo HiSeq
Kit TruSeq Cluster v3 (cBot - HS) con cella a flusso v3	HCS v1.4 o successiva
Kit TruSeq SBS v3 - HS	HCS v1.4 o successiva
TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box (SR oppure PE)	HCS v1.5 o successiva

Per maggiori informazioni sulla compatibilità delle versioni, visitare il sito Web Illumina all'indirizzo www.illumina.com/VersionCompatibility.

Materiali di consumo forniti dall'utente

Materiali di consumo

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
1 N NaOH	Fornitore generico	Lavaggio di manutenzione dello strumento.
Salviettine imbevute di alcol isopropilico al 70% oppure etanolo al 70%	VWR, n. di catalogo 15648-981 Fornitore generico	Pulizia della cella a flusso e del piano della cella a flusso.
Provette per centrifuga, 250 ml	Corning, n. di catalogo 430776	Lavaggio di manutenzione e lavaggio con acqua dello strumento.
Provette coniche, 15 ml	Corning, n. di catalogo 430052	Raccolta e misura del volume degli scarti.
Guanti monouso, privi di polvere	Fornitore generico	Uso generale.
Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle	VWR, n. di catalogo 21905-026	Pulizia del vano portacella.
Carta pulente per lenti, 10x15 cm ca.	VWR, n. di catalogo 52846-001	Pulizia della cella a flusso.
Acqua, da laboratorio, 18 M Ohm	Millipore	Rack reagenti SBS, posizione 2. Lavaggio con acqua.

Avvio del sistema HiSeq

Per avviare il sistema HiSeq e il computer dello strumento attenersi alla procedura descritta qui di seguito.

NOTA

Tenere presente le seguenti prassi migliori quando si esegue l'accensione e lo spegnimento del computer e durante il funzionamento del computer:

Non avviare il computer quando lo strumento è acceso.

Lasciare lo strumento spento per almeno un minuto prima di accenderlo nuovamente.

Non spegnere mai lo strumento quando il software dello strumento è in esecuzione.

Collegare il cavo USB dello strumento, USB del monitor e USB della tastiera nella parte posteriore del server; collegare lo scanner per codice a barre e il mouse nella parte anteriore del server.

Non usare la gestione porte per eliminare le porte.

1. Avviare il computer di controllo dello strumento.
2. Accedere al sistema operativo usando il nome utente predefinito e la password predefinita. Attendere che il caricamento giunga a termine.
   - Nome utente: sbsuser
   - Password: sbs123

   Se i valori predefiniti non funzionano, consultare il personale IT per individuare il nome utente e la password.
3. Portare l'interruttore principale in posizione ON. Se si sta di fronte allo strumento, l'interruttore si trova sul lato sinistro.
4. Attendere l'inizializzazione dell'unità dello strumento denominata "DoNotEject" (Non espellere). Alla conclusione dell'inizializzazione dell'unità si apre una finestra. Chiudere la finestra.

NOTA

Non espellere mai l'unità di tipo flash denominata "DoNotEject" posta all'interno del telaio dello strumento ed evitare di modificare i file su tale unità. Questa unità contiene file della configurazione hardware e si inizializza ogni volta che lo strumento viene acceso.

5. Per garantire uno spazio su disco adeguato, archiviare in rete i dati che si trovano sul computer e provengono dalle analisi precedenti.
6. Aprire il Software di controllo HiSeq (HCS) utilizzando l'icona del collegamento sul desktop del computer. Per l'inizializzazione di HCS, sono necessari alcuni minuti.

Una volta inizializzato il software, si apre la schermata Welcome (Benvenuto) e nella parte inferiore sinistra dello schermo appare l'icona dell'inizializzazione

.

Capitolo 2

Software HiSeq

Introduzione 26
Interfaccia del Software di controllo HiSeq 28
Schermate configurazione corsa 34
Schermate impostazioni pre-corsa 46
Schermate di avvio della corsa 50
Schermata Run Overview (Panoramica corsa) 53
Arresto e riavvio di una corsa 56
Sospensione (pausing) di una corsa 60
Cartelle delle corse 62
Panoramica sul foglio campioni 64
Spazio disponibile sul disco 66

Introduzione

Sul computer dello strumento sono installate tre applicazioni software:

- **HiSeq Control Software**: l'interfaccia del software di controllo HiSeq (HCS) guida l'utente lungo l'intera procedura per specificare i parametri della corsa e caricare la cella a flusso e i reagenti prima di avviare la corsa. Mentre la corsa procede, HCS fornisce un riassunto delle statistiche sulla qualità rilevate durante lo svolgimento della corsa.
- **Real Time Analysis**: il software integrato per l'analisi primaria RTA (Real Time Analysis) esegue l'identificazione delle basi e assegna un punteggio qualitativo a ciascuna base per ciascun ciclo. Per maggiori informazioni, vedere *Panoramica dell'Analisi in tempo reale (RTA)* a pagina 128.
- **Sequencing Analysis Viewer**: il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) fornisce statistiche dettagliate sulla qualità e metriche aggiornate mentre la corsa procede. Per maggiori informazioni, vedere *Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV)* a pagina 131.

Novità in HCS v2.0

HCS v2.0 introduce le seguenti caratteristiche:

- Nuovo flusso di lavoro per la sostituzione delle guarnizioni.
- Miglioramento e applicazione di flussi di lavoro di lavaggio:
  - Timer di lavaggio che richiedono un lavaggio del sistema prima di una corsa di sequenziamento.
  - Lavaggio con acqua ogni 24 ore dal completamento dell'ultimo lavaggio con acqua.
  - Lavaggio di manutenzione ogni 240 ore dal completamento dell'ultimo lavaggio di manutenzione.
  - Il lavaggio di manutenzione è considerato come un lavaggio con acqua in termini di timer e priorità.
  - Il software richiede all'utente di eseguire i lavaggi post-corsa al temine delle corse.
  - Quando si arresta una corsa, HSC richiede un lavaggio se avverte che l'utente non intende riprendere la corsa (Complete for Run - Completare per corsa).
  - L'arresto di una corsa permette di riprendere la corsa senza un lavaggio del sistema.

- L'avvio di una nuova corsa richiede un lavaggio.
- Nuove opzioni per compressione BCL e il binning (raggruppamento) dei punteggi qualitativi per ridurre la dimensione dell'ingombro dei dati.

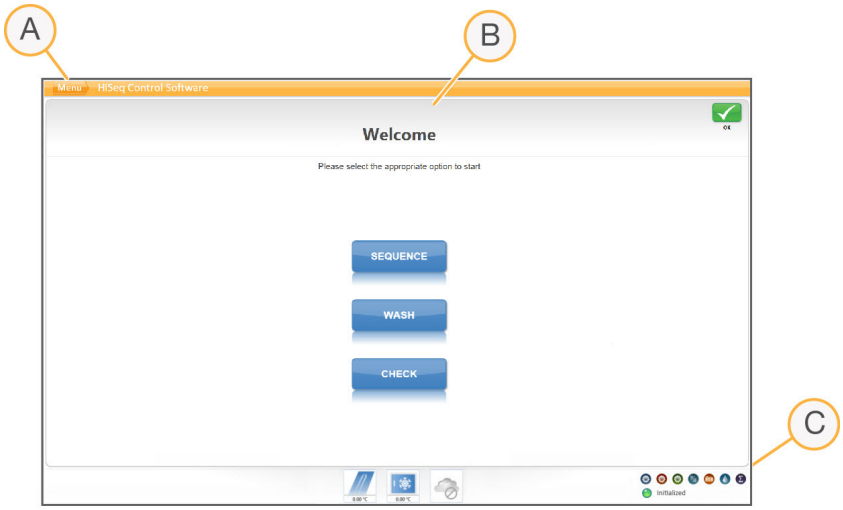
- Verifica fluidica pre-corsa opzionale.
- Supporto per BaseSpace: con BaseSpace, è necessario un foglio campioni.
- Compressione BCL e binning (raggruppamento) dei punteggi qualitativi come richiesto per BaseSpace.

Per scaricare una copia di HCS v2.0, andare alla pagina di supporto HiSeq all'indirizzo http://www.illumina.com e fare clic sulla scheda Downloads (Download). È necessario un login MyIllumina.

Interfaccia del Software di controllo HiSeq

L'interfaccia HCS visualizza la schermata di configurazione della corsa.

Figura 8 Interfaccia HCS, schermata Welcome (Benvenuto)



A Pulsante del menu della schermata Welcome (Benvenuto)
B Riquadro interfaccia principale
C Indicatori di attività

Menu della schermata Welcome (Benvenuto)

Il pulsante del menu della schermata Welcome (Benvenuto), posto nell'angolo superiore sinistro della schermata Welcome, fornisce le seguenti opzioni:

- **View** (Visualizza): fornisce opzioni per visualizzare l'interfaccia a schermo intero o in una finestra, o per minimizzare l'interfaccia.
- **Tools** (Strumenti): fornisce l'accesso alla finestra Options (Opzioni) e al file Show Log:
  - **Options** (Opzioni): dalla finestra Options (Opzioni), è possibile definire il templato del nome della cartella della corsa, le posizioni delle cartelle predefinite e il server, nome utente e password di LIMS relativi alla corsa. Vedere *Menu della finestra Options (Opzioni)* a pagina 29.

- **Show Log File** (File "Show Log"): il file Show Log è un file di testo utilizzato per la risoluzione dei problemi.

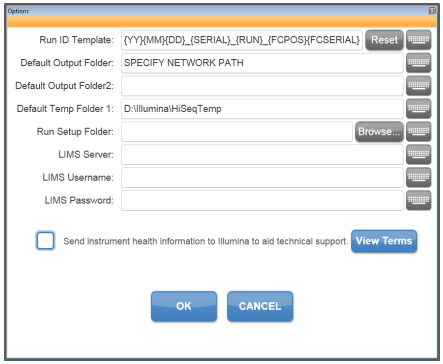
- **Scanner** (Scanner): attiva il comando per inizializzare il software manualmente.
- **About** (Info su): fornisce informazioni sull'hardware dello strumento, sulle versioni del software e su come mettersi in contatto con l'Assistenza tecnica.
- **Exit** (Esci): chiude l'interfaccia CS.

Figura 9 Pulsante del menu

Menu della finestra Options (Opzioni)

Dalla finestra Options (Opzioni), è possibile definire il templato del nome della cartella della corsa, le posizioni delle cartelle predefinite e il server, nome utente e password per LIMS relativi alla corsa.

Figura 10 Menu della finestra Options (Opzioni)



Run ID Template (Templato del nome cartella corsa): il nome utilizzato per il nome di una cartella della corsa

Default Output Folder (Cartella di output predefinita): la posizione predefinita in cui salvare le corse con la cella a flusso A. Questo può essere cambiato corsa per corsa

Default Output Folder2 (Cartella di output predefinita 2): la posizione predefinita in cui salvare le corse con la cella a flusso B. Questo può essere cambiato corsa per corsa

Default Temp Folder1 (Cartella temporanea predefinita 1): la posizione in cui possono essere scritti i file temporanei durante una corsa

Run Setup Folder (Cartella impostazioni corsa): la posizione in cui HiSeq prenderà i moduli campioni LIMS

LIMS Server (Server LIMS): il nome del server per l'interazione con i file LIMS supportati da Illumina

LIMS Username (Nome utente LIMS): il nome utente LIMS che HiSeq utilizzerà per l'autenticazione dei file LIMS Illumina

LIMS Password (Password LIMS): la password LIMS che HiSeq utilizzerà per l'autenticazione dei file LIMS Illumina

Send instrument health information to Illumina to aid technical support (Invia informazioni sulla salute del sistema per aiutare il supporto tecnico Illumina): permette allo strumento di inviare informazioni a BaseSpace per ogni corsa. Tutte le informazioni saranno confidenziali. Illumina raccomanda di tenere attiva questa funzione e non condividerà mai queste informazioni. I dati dei campioni della corsa saranno inviati solo se nella schermata Storage (Archiviazione) è stato indicato che si desidera inviare tali dati. Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Storage (Archiviazione)* a pagina 35.

Opzioni della schermata di avvio

La schermata Welcome (Benvenuto) presenta le opzioni seguenti:

- Sequence (Sequenzia)
- Wash (Lavaggio)
- Check (Controllo)

Sequence (Sequenzia): selezionare **Sequence** per iniziare le fasi di impostazione di una corsa di sequenziamento. Dal pulsante Sequence l'utente può avviare una nuova corsa o riprendere una corsa esistente.

Figura 11 Opzioni del comando Sequence (Sequenzia)

- **New Run** (Nuova corsa): il software guida l'utente lungo l'intera procedura di impostazione dei parametri della corsa, caricamento e priming dei reagenti, caricamento della cella a flusso, esecuzione delle verifiche della fluidica e avvio della corsa.
- **Resume Run** (Ripresa corsa): il software guida l'utente lungo l'intera procedura di scelta della cartella della corsa esistente e di impostazione dei parametri per la ripresa della corsa.

Wash (Lavaggio): selezionare **Wash** per avviare il lavaggio dello strumento. Dal pulsante Wash, l'utente può avviare un Water Wash (Lavaggio con acqua) o un Maintenance Wash (Lavaggio di manutenzione).

Figura 12 Opzioni del comando Wash (Lavaggio)

- **Water Wash** (Lavaggio con acqua): il lavaggio con acqua fa scorrere acqua nel sistema. Si raccomanda un lavaggio con acqua prima dell'avvio di una nuova corsa o se il sistema è rimasto inattivo per un giorno o più. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio con acqua* a pagina 122.
- **Maintenance Wash** (Lavaggio di manutenzione): il lavaggio di manutenzione fa scorrere nel sistema acqua, poi NaOH e poi acqua. Questo lavaggio è raccomandato dopo ogni corsa di sequenziamento. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione dello strumento* a pagina 118.

Check (Controllo): selezionare **Check** per aprire la schermata di verifica della fluidica e per confermare il flusso corretto durante l'installazione dello strumento o la risoluzione dei problemi della fluidica. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di una verifica della fluidica* a pagina 142.

Indicatori di attività

Nell'angolo inferiore destro, la schermata Welcome (Benvenuto) contiene una serie di icone che indicano quale attività lo strumento sta eseguendo.

Figura 13 Indicatori di attività. Da sinistra a destra, le icone rappresentano i motori X, Y e Z, la funzionalità dell'elettronica, la videocamera, il sistema della fluidica e le funzioni di elaborazione.

Figura 14 Indicatori di attività. Da sinistra a destra, le icone rappresentano la temperatura della cella a flusso A, la temperatura del vano refrigerato per i reagenti, lo stato di cloud computing BaseSpace e la temperatura della cella a flusso B.

Icone di stato

Le icone di stato sono poste nell'angolo superiore destro di ciascuna schermata e segnalano eventuali cambiamenti delle condizioni operative durante l'impostazione o l'esecuzione della corsa.

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Stato OK	Nessun cambiamento. Le condizioni del sistema sono normali.
	Informazione	Solo a fini informativi. Non si richiede alcun intervento.
	Attenzione	Informazione che richiama l'attenzione dell'utente.
	Avvertenza	Le avvertenze non provocano l'arresto della corsa, ma possono subordinarne il proseguimento a un intervento dell'utente.
	Errore	In genere gli errori provocano l'arresto della corsa, che potrà continuare solo dopo un intervento dell'utente.

Quando si verifica un cambiamento nelle condizioni operative, l'icona cambia per mostrare l'immagine associata e lampeggia per avvertire l'utente. In tal caso, selezionare l'icona per aprire la finestra di stato contenente una descrizione generale della condizione segnalata. Selezionare **Acknowledge** (Accetta) per confermare di aver letto il messaggio e **Close** (Chiudi) per chiudere la finestra di dialogo.

È possibile filtrare il tipo di messaggi che appaiono nella finestra di stato selezionando le icone situate lungo il margine superiore della finestra. Selezionare un'icona per mostrare/nascondere la condizione associata.

NOTA

Per maggiori informazioni su problemi noti relativi a errori e avvertenze, vedere le note di rilascio per la versione del software di controllo dello strumento che si sta utilizzando.

Schermate configurazione corsa

Quando si seleziona **Sequence** | **New Run** (Sequenzia | Nuova corsa) dalla schermata Welcome (Benvenuto), il software apre le schermate di impostazione corsa che guidano l'utente attraverso le fasi di impostazione della corsa, iniziando con le schermate sulla scheda Run Configuration (Configurazione corsa).

Ciascuna schermata di configurazione della corsa contiene elenchi a tendina, caselle di controllo o campi di testo. Usare lo scanner portatile per codici a barre per scansionare l'ID della cella a flusso o del kit di reagenti, oppure inserire l'ID utilizzando la tastiera di tipo touch screen. L'icona della tastiera si trova a destra dei campi per il testo.

Quando si è finito di inserire le informazioni su ciascuna schermata, il pulsante Next (Avanti) diventa attivo. Selezionare **Next** (Avanti) per passare alla schermata successiva o selezionare **Back** (Indietro) per tornare alla schermata precedente. In qualunque momento durante le fasi di impostazione della corsa, è possibile selezionare **Cancel** (Annulla) per annullare (abort) l'impostazione della corsa e ritornare alla schermata Welcome (Benvenuto).

Sostituzione delle guarnizioni

Al termine di una corsa, il software apre le schermata Gasket Change (Sostituzione delle guarnizioni) che guidano l'utente nell'esecuzione di un lavaggio di manutenzione.

1. **Load Gasket** (Caricamento guarnizione): viene richiesto di caricare una nuova guarnizione.
2. **Load Wash Reagents** (Caricamento reagenti di lavaggio): viene richiesto di caricare i reagenti di lavaggio.
3. **Load Wash Flow Cell** (Caricamento cella a flusso per il lavaggio): viene richiesto di caricare una cella a flusso non per il sequenziamento e di inserire l'ID della cella a flusso per il lavaggio.
4. **Fluidics Check** (Verifica fluidica): viene richiesto di selezionare una soluzione. Utilizzare i valori predefiniti per Volume (Volume), Aspiration Rate (Velocità di aspirazione) e Dispense Rate (Velocità di erogazione).
5. **Wash** (Lavaggio): lo strumento esegue un lavaggio.

6 **Load Solvent** (Caricamento solvente): viene richiesto di caricare NaOH in tutte le posizioni per il lavaggio.

7 **Solvent Wash** (Lavaggio con solvente): lo strumento esegue un lavaggio con solvente.

8 **Load Wash Reagents** (Caricamento reagenti di lavaggio): viene richiesto di caricare i reagenti di lavaggio.

9 **Wash** (Lavaggio): lo strumento esegue un lavaggio.

Lavaggio di manutenzione

Se richiesto, HCS richiede di eseguire un lavaggio di manutenzione prima di una corsa. In tutti i casi, un lavaggio di manutenzione è raccomandato dopo una corsa .

1 **Load Wash Reagents** (Caricamento reagenti di lavaggio): viene richiesto di caricare i reagenti di lavaggio.

2 **Load Wash Flow Cell** (Caricamento cella a flusso per il lavaggio): viene richiesto di caricare una cella a flusso non per il sequenziamento e di inserire l'ID della cella a flusso per il lavaggio.

3 **Fluidics Check** (Verifica fluidica): viene richiesto di selezionare una soluzione. Utilizzare i valori predefiniti per Volume (Volume), Aspiration Rate (Velocità di aspirazione) e Dispense Rate (Velocità di erogazione).

4 **Wash** (Lavaggio): lo strumento esegue un lavaggio.

5 **Load Solvent** (Caricamento solvente): viene richiesto di caricare NaOH in tutte le posizioni per il lavaggio.

6 **Solvent Wash** (Lavaggio con solvente): lo strumento esegue un lavaggio con solvente.

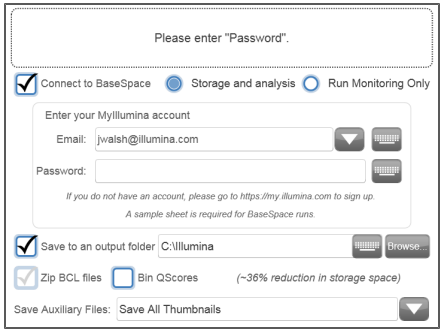
7 **Load Wash Reagents** (Caricamento reagenti di lavaggio): viene richiesto di caricare i reagenti di lavaggio.

8 **Wash** (Lavaggio): lo strumento esegue un lavaggio.

Schermata Storage (Archiviazione)

La schermata Storage (Archiviazione) permette di definire la posizione in cui i dati della corsa verranno messi e archiviati.

Figura 15 Schermata Storage (Archiviazione) (Output elevato)



- **Connect to BaseSpace** (Connessione a BaseSpace): quando si seleziona questa opzione all'utente viene richiesto di inserire le informazioni relative all'account Illumina. L'opzione sottostante Zip BCL files (Comprimere file BCL) sarà selezionata come predefinita. Illumina raccomanda di salvare i file anche localmente. Per salvare i file localmente, selezionare **Save to an out put folder** (Salva su un folder di output) e inserire un percorso.
- **Storage and analysis** (Archiviazione e analisi): questa opzione permette a HiSeq di inviare a BaseSpace i dati della corsa e le informazioni relative alla salute del sistema.
- **Run Monitoring Only** (Solo monitoraggio corsa): questa opzione invia a BaseSpace solo le informazioni relative alla salute del sistema.

NOTA

Per ogni corsa, HiSeq tenterà di inviare a BaseSpace almeno le metriche generali relative alla corsa. Le metriche sono inviate anonimamente, associate con HiSeq dal quale provengono, e non ad un utente particolare. Le metriche includono i file interoperativi (che utilizza il visualizzatore SAV) e i file globali quali RunInfo.xml e RunParameters.xml. Non viene inviato nessun file di dati a meno che l'utente non abbia indicato questa opzione.

I permessi per questa funzione sono attivati come predefiniti e Illumina raccomanda di lasciarli attivati. Per disattivare i permessi, selezionare **Menu** | **Tools** | **Options** (Menu | Strumenti | Opzioni) e quindi deselezionare **Send system health information to Illumina to aid technical support** (Invia informazioni sulla salute del sistema per aiutare il supporto tecnico Illumina). È possibile visualizzare i termini nella finestra di dialogo Options (Opzioni).

Se i permessi per questa funzione non sono attivati, HCS richiede di accettare i Terms and Conditions (Termini e condizioni). Se i termini e le condizioni non vengono accettate, non è possibile utilizzare BaseSpace. Se non si utilizza BaseSpace, tornare alla schermata precedente e assicurarsi che l'opzione BaseSpace sia deselezionata. In caso contrario il pulsante Next (Avanti) non sarà attivato.

- **Save to an output folder** (Salva su una cartella di output): inserire il percorso della cartella della corsa, che è la destinazione di tutti i file di output. Illumina raccomanda di specificare un percorso di rete per la cartella della corsa. Per maggiori informazioni, vedere *Cartelle delle corse* a pagina 62.
- **Zip BCL files** (Comprimere file BCL): permette di ridurre l'ingombro di spazio su disco necessario per la corsa. Se si utilizza BaseSpace, i file vengono compressi come opzione predefinita.
- **Bin QScores** (Bin - Raggruppamento dei punteggi qualitativi): permette di ridurre l'ingombro di spazio su disco necessario per la corsa. Questo grazie al raggruppamento dei punteggi qualitativi su un più ampio intervallo di valori. Per i dettagli tecnici su come la risoluzione dei dati dei punteggi qualitativi possono essere ridotti senza sacrificare l'accuratezza del punteggio o l'analisi standard e l'identificazione di varianti, consultare il white paper disponibile sul sito Web www.Illumina.com intitolato *Reducing Whole-Genome Data Storage Footprint* (Riduzione dell'ingombro dei dati di archiviazione genomici).
- **Save Auxiliary Files** (Salva file ausiliari): questa opzione permette di definire quali file di imaging saranno salvati.
  - **Save All Thumbnails** (Salva tutte le miniature): le immagini delle miniature sono una combinazione di otto immagini da ciascuna striscia, combinate in un'unica miniatura. Una striscia è una colonna di tile (piastrine) e ci sono tre strisce per

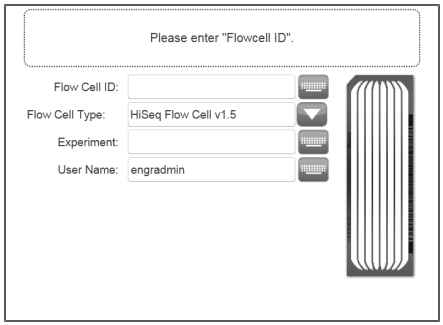
corsia per superficie. Save All Thumbnails (Salva tutte le miniature) salva le miniature delle strisce e le miniature delle tile (piastrine).

- **Save Tile Thumbnails** (Salva miniature delle tile): questa opzione salva solo le miniature delle tile (piastrine). Le miniature delle tile mostrano solo la tile piuttosto che l'intera striscia.

Schermata Flow Cell Set-up (Impostazione cella a flusso)

La schermata Flow Cell Set-up (Impostazione cella a flusso) è la schermata di configurazione della corsa nella quale si registrano le informazioni relative alla corsa, partendo dall'ID della cella a flusso.

Figura 16 Schermata Flow Cell Set-up (Impostazione cella a flusso) per una cella a flusso High Output (Output elevato)



NOTA
È fondamentale che quando si imposta la corsa venga scansionato il codice a barre della cella a flusso o venga inserito con precisione l'ID della cella a flusso. Il software utilizza l'ID della cella a flusso per determinare il tipo di cella a flusso e la compatibilità dei componenti.

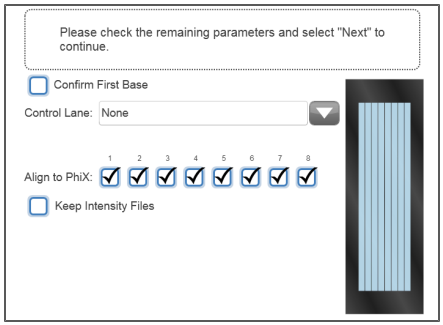
- **Flow Cell ID** (ID cella a flusso): inserire l'ID della nuova cella a flusso. Si può inserire l'ID della cella a flusso utilizzando lo scanner per codice a barre, la tastiera oppure la tastiera di tipo touch screen. Utilizzare lo scanner per codice a barre per assicurare l'accuratezza; altrimenti, inserire con cura l'ID della cella a flusso.
- **Flow Cell Type** (Tipo di cella a flusso): il tipo appropriato di cella a flusso è selezionato automaticamente secondo l'ID della cella a flusso. Il software utilizza queste informazioni per confermare la compatibilità della cella a flusso con il software dello strumento e con i componenti della corsa. Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Recipe (Ricetta)* a pagina 40.

- **Experiment** (Esperimento): inserire un nome a scelta per l'esperimento. Il nome appare in alto in ciascuna schermata dell'interfaccia per aiutare a individuare la corsa di sequenziamento in corso.
- **User Name** (Nome utente): inserire il nome della persona che sta impostando la corsa.

Schermata Advanced (Avanzato)

La schermata Advanced (Avanzato) include le impostazioni per la conferma della prima base e per indicare le corsie per l'allineamento.

Figura 17 Schermata Advanced (Avanzato) per una cella a flusso High Output (Output elevato)



- **Confirm First Base** (Conferma prima base): selezionare la casella di controllo per ottenere una finestra di dialogo di conferma della prima base che fornisce l'opzione di interrompere il ciclo a questo punto o di continuare. Se si seleziona questa opzione occorre confermare i risultati prima che la corsa possa continuare.
  Se non si seleziona la casella di controllo, il report prima base è generato nel solito modo e la corsa continua senza mostrare la finestra di dialogo per la conferma del report prima base. Durante la corsa in qualsiasi momento si può accedere al report prima base dalla cartella della corsa. Per maggiori informazioni, vedere *Conferma report della prima base* a pagina 54.
- **Control Lane** (Corsia di controllo): se applicabile, dall'elenco a tendina selezionare la corsia sulla cella a flusso che contiene la libreria di controllo. Altrimenti, selezionare **None** (Nessuna).
- **Align to PhiX** (Allineamento con PhiX): permette il report in tempo reale delle percentuali di errore per le corsie del controllo PhiX o per le corsie con aggiunta di PhiX. Come impostazione predefinita, tutte le corsie sono selezionate per l'allineamento in tempo reale da parte di RTA. Deselezionare la casella di controllo per le corsie che

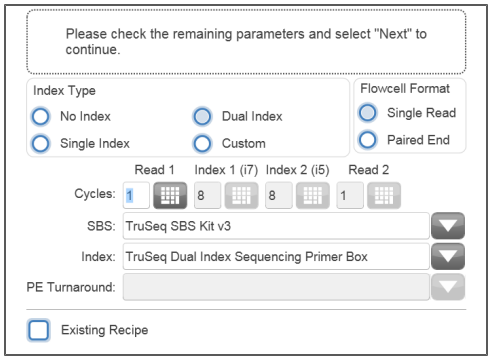
non abbiano PhiX aggiunto al campione, in modo tale che RTA non allinei e non calcoli dei tassi di errore per quella corsia, causando percentuali di errore arbitrariamente elevati. Per maggiori informazioni, vedere *Utilizzo di un controllo PhiX per corse di sequenziamento HiSeq*, disponibile nella pagina di supporto HiSeq sul sito Web Illumina all'indirizzo http://www.illumina.com.

- **Keep Intensity Files** (Mantieni i file intensità): selezionare la casella di controllo per salvare i file delle intensità dei cluster (*.cif) per successiva ri-analisi, risoluzione dei problemi o analisi personalizzate. Il salvataggio dei file delle intensità non è necessario per le analisi integrate sullo strumento. L'attivazione di questa opzione aumenta significativamente la dimensione della cartella di output dei dati. Come impostazione predefinita, questa opzione non è selezionata.

Schermata Recipe (Ricetta)

A partire dalle informazioni che l'utente inserisce nella schermata Recipe (Ricetta), il software crea una ricetta specifica per la corsa. La ricetta è copiata automaticamente nella cartella della corsa e salvata nelle sottocartella Recipe (Ricetta). La ricetta salvata include solo il numero di cicli per ogni lettura o indice; non salva le opzioni per corsia di controllo, allineamento PhiX, immagini o file .cif.

Figura 18 Schermata Recipe (Ricetta) per una cella a flusso High Output (Output elevato) con doppia indicizzazione selezionata



Index tipe (Tipo di indice)

- Selezionare **No Index** (Nessun indice) per eseguire una corsa non indicizzata.

- Selezionare **Single Index** (Singolo indice) per eseguire una corsa con una Lettura Indici immediatamente dopo la Lettura 1. La lunghezza della Lettura Indici dipende dal kit selezionato dall'utente dall'elenco a tendina **Index** (Indice). Le librerie a singola indicizzazione richiedono sette cicli e le librerie a doppia indicizzazione richiedono otto cicli.
- Selezionare **Dual Index** (Doppio indice) per sequenziare librerie a doppia indicizzazione con due Letture Indici da otto cicli immediatamente dopo la Lettura 1. La seconda Lettura Indici include sette cicli di sola chimica prima di otto cicli di imaging.
- Selezionare **Custom** (Personalizzato) per eseguire una corsa a singola indicizzazione o a doppia indicizzazione con un numero personalizzato di cicli per ciascuna Lettura Indici.

Flow Cell Format (Formato della cella a flusso)

Questa opzione appare quando è stato selezionato Dual Index (Doppio indice) oppure Custom (Personalizzata) per il tipo di indice. Selezionare un **Flow Cell Format** (Formato cella a flusso): **Single Read** (Unidirezionale) o **Paired End** (Bidirezionale).
Le corse unidirezionali a doppia indicizzazione possono essere eseguite su celle a flusso unidirezionali o su celle a flusso bidirezionali con adattamenti di ricetta. La selezione in CS, cella a flusso bidirezionale o unidirezionale, determina il tipo di ricetta. Utilizzare sempre la confezione appropriata di primer di sequenziamento a doppia indicizzazione secondo il tipo di cella a flusso impiegata.

NOTA
Le corse bidirezionali a doppia indicizzazione devono obbligatoriamente essere eseguite su celle a flusso bidirezionali.

Cycles (Cicli)

- **Cycles** (Cicli): inserire il numero di cicli che si intende sequenziare per ciascuna lettura incluse la Lettura 1, le Letture Indici e la Lettura 2.

NOTA
Aggiungere sempre un ciclo al totale dei cicli di Lettura 1 o Lettura 2. Ad esempio, per eseguire 100 cicli per la Lettura 1, inserire 101. Per eseguire 50 cicli per la Lettura 1, inserire 51.

Il numero di cicli eseguito in una lettura è uno in più rispetto al numero di cicli analizzati. L'ultimo ciclo è necessario per i calcoli di fase e pre-fase (phasing and prephasing).

  - Per le corse bidirezionali, inserire lo **stesso** numero di cicli per Lettura 2 come inserito per Lettura 1; oppure, se è stata selezionata l'opzione di indicizzazione

Custom (Personalizzata), inserire il numero di cicli per ogni Lettura Indice (la lunghezza della Lettura non deve essere identica).

NOTA
Selezionando **Single Index** (Singolo indice) o **Dual Index** (Doppio indice), i valori di numero di cicli di indicizzazione sono inseriti automaticamente.

SBS

Con HCS v2.0 e successive, le versioni di kit compatibili per chimica SBS, Indice e Inversione PE sono inserite come impostazione predefinita secondo l'ID della cella a flusso inserita dall'utente nella schermata Scan (Scansione).

La tabella seguente elenca il nome predefinito del kit come riportato nella schermata Recipe (Ricetta) per ciascun tipo di cella a flusso:

Tipo di cella a flusso	SBS	Indice	Cluster e/o Inversione PE
Cella a Flusso HiSeq v3	Kit TruSeq SBS v3	TruSeq Multiplex Sequencing Primer Box *(librerie a singola indicizzazione)* o TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box *(librerie a doppia indicizzazione)*	Kit TruSeq PE Cluster v3 - cBot - HS

NOTA
La confezione TruSeq Multiplex Sequencing Primer Box fa parte del kit TruSeq Cluster v3. I reagenti forniti in questi kit possono essere utilizzati con qualsiasi tipo di cella a flusso High Output (Output elevato).

Index (Indice)

Questo è il nome del kit Illumina utilizzato per i reagenti di indicizzazione.

Existing Recipe (Ricetta esistente)

Se si sceglie di usare per la corsa una ricetta personalizzata, inserire il percorso e il nome della ricetta. Altrimenti lasciare vuota questa casella di controllo. Illumina raccomanda di usare la procedura guidata per costruire la propria ricetta in base alle informazioni inserite nella schermata Recipe (Ricetta).

Schermata Sample Sheet (Foglio campioni)

NOTA
Per visualizzare i risultati di indicizzazione nel Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV), è essenziale che all'inizio della corsa l'utente carichi un foglio campioni. Per riportare correttamente le informazioni di indicizzazione, SAV v1.8 richiede un foglio campioni. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente del Visualizzatore analisi di sequenziamento* n. codice 15020619.

Nel campo **Sample Sheet** (Foglio campioni), inserire il percorso di un foglio campioni valido per la corsa. Quando la corsa inizia, il software copia il foglio campioni nella cartella della corsa. A meno che non si stia utilizzando BaseSpace, un foglio campioni è facoltativo. Per le corse indicizzate, il foglio campioni è richiesto se si desidera che gli indici siano riportati in SAV; se si sta utilizzando BaseSpace, è richiesto un foglio campioni. Per maggiori informazioni sui fogli campioni, vedere *Panoramica sul foglio campioni* a pagina 64.

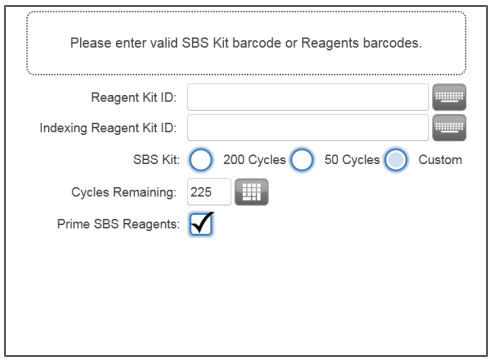
Figura 19 Schermata Sample Sheet (Foglio campioni) per una cella a flusso High Output (Output elevato)

Se alla corsa è associato un foglio campioni, nel Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) v1.8.4 (o successiva) si possono visualizzare le informazioni specifiche sugli indici. Per ulteriori informazioni, vedere la *Guida per l'utente del Visualizzatore analisi di sequenziamento*, n. codice 15020619.

Schermata Reagents (Reagenti)

La schermata Reagents (Reagenti) registra informazioni sui reagenti utilizzati per la corsa.

Figura 20 Schermata Reagents (Reagenti) in modalità (Output elevato)



- **Reagent Kit ID** (ID kit reagenti): inserire l'ID del kit reagenti SBS dalla confezione 1 oppure dalla confezione 2 del kit SBS utilizzando lo scanner per codice a barre, la tastiera oppure la tastiera di tipo touch screen.
- **Indexing Reagent Kit ID** (ID kit reagenti di indicizzazione): inserire l'ID del kit reagenti di indicizzazione utilizzando lo scanner per codice a barre, la tastiera oppure la tastiera di tipo touch screen. L'ID del kit reagenti di indicizzazione è il codice a barre del kit di reagenti utilizzato per una corsa di indicizzazione.
- **SBS Kit** (Kit SBS): selezionare il Kit SBS che si sta utilizzando per la corsa, a 200 cicli o 50 cicli o il numero di cicli che si desidera definire. La selezione dell'utente compila automaticamente il campo SBS Cycles Remaining (Cicli SBS rimanenti) secondo il numero di cicli supportato da quel kit.
- **Cycles Remaining** (Cicli rimanenti): questo campo è compilato automaticamente secondo il kit SBS che si sta utilizzando. Se si sta utilizzando un kit parziale, inserire il numero di cicli per il quale si prevede che i reagenti durino. Il software esegue un conteggio alla rovescia sul numero di cicli inserito. Quando il numero di cicli comincia a essere basso, il software chiede all'utente di caricare reagenti freschi. Per maggiori informazioni, vedere *Sostituzione dei reagenti durante una corsa* a pagina 60.

NOTA
Se si sta avviando una nuova corsa utilizzando meno di un kit completo di reagenti, fare in modo di essere poi presenti nel momento in cui i reagenti saranno necessari.

- **Prime SBS Reagents** (Priming reagenti SBS): selezionare questa casella di controllo per il priming dei reagenti prima di avviare la corsa. Eseguire sempre il priming dei reagenti prima di caricare una cella a flusso nuova.

Schermata Review (Revisione)

La schermata Review (Revisione) elenca le informazioni inserite dall'utente per la corsa. Se è necessario modificare degli inserimenti, selezionare **Back** (Indietro).

Schermate impostazioni pre-corsa

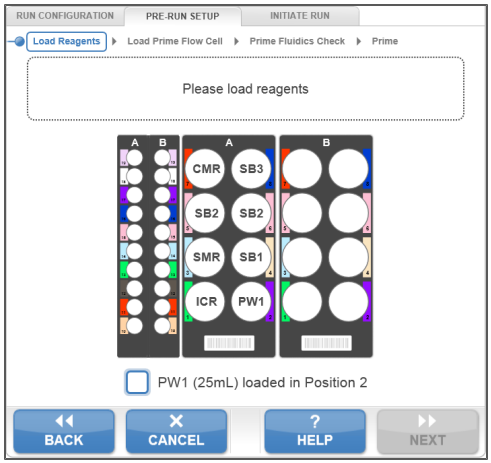
Dopo l'inserimento delle informazioni richieste nelle schermate di configurazione della corsa, si aprono le schermate delle impostazioni pre-corsa. Le schermate delle impostazioni pre-corsa includono: Load Reagents, Load Prime Flow Cell, Prime Fluidics Check e Prime (Caricamento reagenti, Caricamento cella a flusso per il priming, Verifica della fluidica per il priming e Priming).

Schermata Load Reagents (Caricamento reagenti)

La schermata Load Reagents (Caricamento reagenti) chiede all'utente di caricare i reagenti SBS. Se si è specificato il numero di cicli per l'indicizzazione, il software chiede all'utente di caricare nel rack bidirezionale i reagenti per l'indicizzazione.

Dopo la Lettura 1 di una corsa bidirezionale, il software si pone in pausa per permettere il caricamento dei reagenti bidirezionali. I reagenti bidirezionali devono obbligatoriamente essere caricati prima della risintesi Lettura 2.

Figura 21 Schermata Load Reagents (Caricamento reagenti) per una cella a flusso High Output (Output elevato)



NOTA

In preparazione del risciacquo post-corsa alla fine di una corsa di sequenziamento, è importante caricare 25 ml di PW1 o di acqua da laboratorio nella posizione 2 quando si

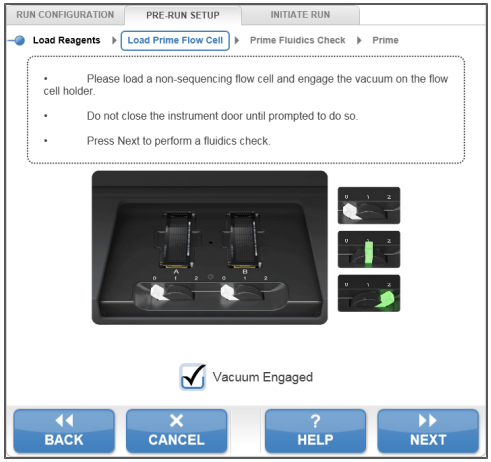
caricano i reagenti SBS all'inizio della corsa.
Il risciacquo post-corsa ***non*** sostituisce il lavaggio post-corsa dello strumento.

Schermata Load Prime Flow Cell (Caricamento cella a flusso per il priming)

La schermata Load Prime Flow Cell (Caricamento cella a flusso per il priming) chiede all'utente di caricare una cella a flusso *usata*, per eseguire la fase di priming. Dopo il caricamento di una cella a flusso usata, confermare che la pompa a vuoto sia posizionata correttamente.

NOTA
Illumina consiglia di usare la cella a flusso proveniente da una corsa precedente per il priming dei reagenti per una corsa successiva o per un lavaggio di manutenzione post-corsa.

Figura 22 Schermata Load Prime Flow Cell (Caricamento cella a flusso per il priming) per le celle a flusso High Output (Output elevato)



Schermata Prime Fluidics Check (Verifica fluidica per il priming)

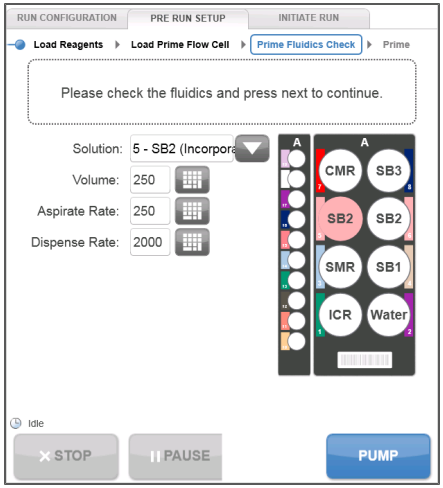
La schermata Prime Fluidics Check (Verifica fluidica per il priming) chiede all'utente di confermare il flusso corretto prima di eseguire il priming dei reagenti. Selezionare **Pump** (Pompa) per avviare la verifica della fluidica.

Da questa schermata è possibile sospendere o annullare la verifica della fluidica:

- Selezionare **Pause** (Pausa) per sospendere temporaneamente la verifica della fluidica. Il pulsante Pause (Pausa) cambia, diventando Resume (Ripresa).

- Selezionare **Resume** (Ripresa) per continuare.
- Selezionare **Stop** (Arresto) per annullare la verifica della fluidica.

Figura 23 Schermata Prime Fluidics Check (Verifica fluidica per il priming)



Schermata Prime (Priming)

Dalla schermata Prime (Priming) l'utente può monitorare la fase di priming in corso. Selezionare **Start Prime** (Avvia priming) per iniziare, o selezionare **Skip Prime** (Salta priming) se si è già eseguito il priming dei reagenti.

Figura 24 Schermata Prime (Priming)

Da questa schermata è possibile sospendere o annullare il priming:

- Selezionare **Pause** (Pausa) per sospendere temporaneamente il priming. Il pulsante Pause (Pausa) cambia, diventando Resume (Ripresa).
- Selezionare **Resume** (Ripresa) per continuare.
- Selezionare **Stop** (Arresto) per arrestare il priming.
- Selezionare **Cancel** (Annulla) per annullare (abort) l'impostazione della corsa e ritornare alla schermata Welcome (Benvenuto).

Al completamento del priming, si aprono automaticamente le schermate di avvio della corsa.

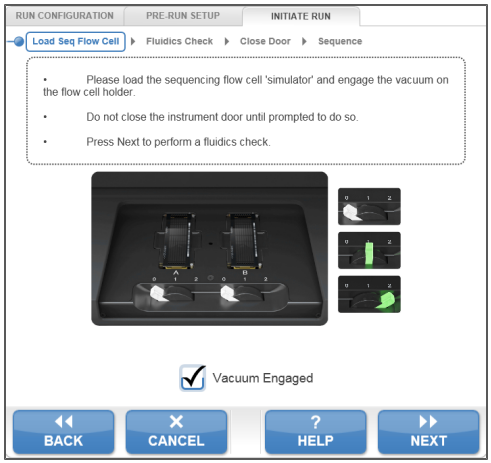
Schermate di avvio della corsa

Dopo che l'utente ha caricato i reagenti e ne ha eseguito il priming, il software apre le schermate di avvio della corsa. Le schermate includono Load Sequencing Flow Cell, Fluidics Check e Close Door (Caricamento cella a flusso, Verifica della fluidica e Chiusura sportello).

Schermata Load Sequencing Flow Cell (Caricamento cella a flusso di sequenziamento)

La schermata Load Sequencing Flow Cell (Caricamento cella a flusso di sequenziamento) illustra le fasi per il caricamento della cella a flusso con cluster e per posizionare correttamente la pompa a vuoto. Quando la pompa a vuoto è posizionata correttamente, il sistema seleziona automaticamente la casella di spunta Vacuum Engaged (Pompa a vuoto attiva).

Figura 25 Schermata Load Seq Flow Cell (Caricamento cella a flusso di sequenziamento) per la cella a flusso High Output (Output elevato)

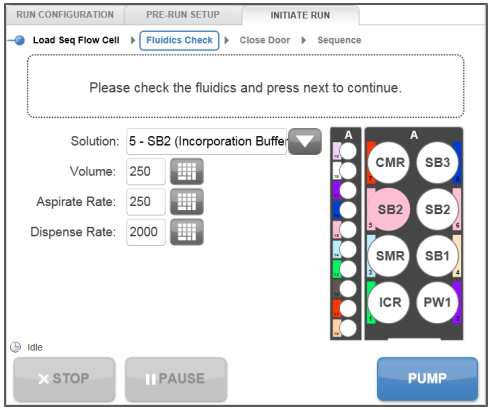


Schermata Fluidics Check (Verifica della fluidica)

La schermata Fluidics Check (Verifica della fluidica) chiede all'utente di confermare il flusso corretto prima di inziare la corsa di sequenziamento.

Per una verifica della fluidica su una cella a flusso con cluster, SB2 ***deve*** obbligatoriamente essere selezionato. Utilizzare i valori preimpostati di volume, velocità di aspirazione e velocità erogazione. Se si deve ripetere la verifica della fluidica, alternare tra la posizione 5 e la posizione 6.

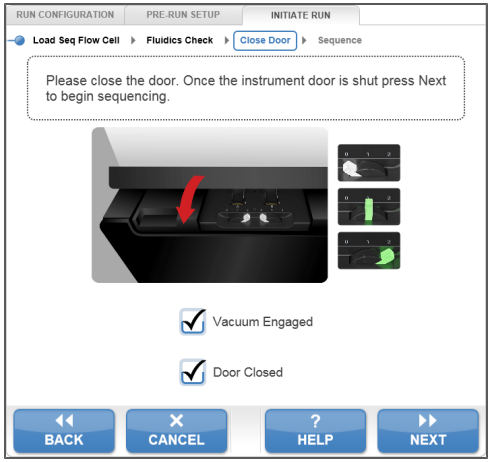
Figura 26 Schermata Fluidics Check (Verifica della fluidica) per una cella a flusso High Output (Output elevato)



Schermata Close Door (Chiusura sportello)

La schermata Close Door (Chiusura sportello) chiede di chiudere lo sportello dello scomparto delle celle a flusso. Il sistema conferma che la pompa a vuoto è posizionata correttamente e che lo sportello dello scomparto delle celle a flusso è chiuso. Quando il sistema è pronto le caselle di spunta sono selezionate automaticamente.

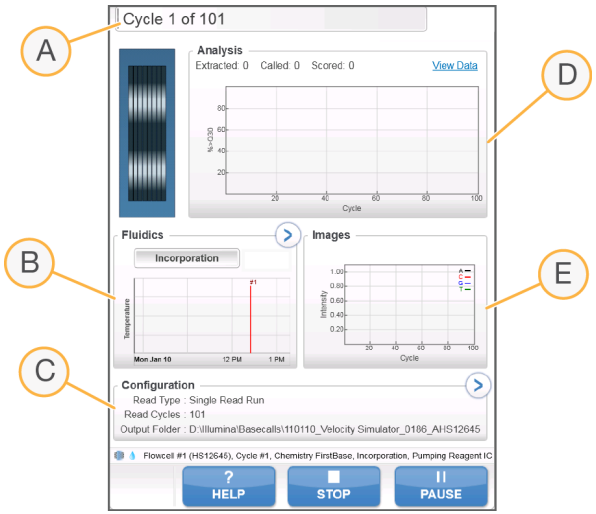
Figura 27 Schermata Close Door (Chiusura sportello)



Schermata Run Overview (Panoramica corsa)

La schermata Run Overview (Panoramica corsa) fornisce una panoramica dell'avanzamento della corsa, dello stato della fluidica, dello stato dell'imaging e delle intensità secondo il ciclo.

Figura 28 Schermata Run Overview (Panoramica corsa) per una cella a flusso High Output (Output elevato)

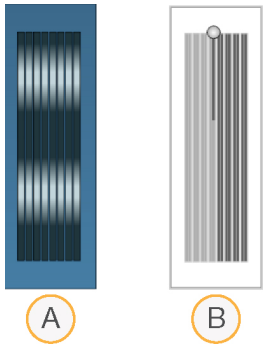


A Avanzamento della corsa
B Fluidica e temperatura
C Configurazione corsa
D Analisi
E Immagini

Questa schermata contiene le seguenti sezioni, per il monitoraggio della corsa:

- **Run Progress** (Avanzamento corsa): fornisce una rappresentazione visiva dell'avanzamento della corsa ed elenca il numero di cicli completati. L'avanzamento della corsa è indicato da una barra grafica d'avanzamento a da un'immagine della cella a flusso. La barra d'avanzamento nella parte alta dello schermo mostra il numero di cicli completati, mentre l'immagine della cella a flusso illustra quali corsie sono state sottoposte a imaging in quel ciclo.

- Un grigio chiaro indica che la corsia è stata sottoposta a imaging; un grigio scuro indica che la corsia non è stata sottoposta a imaging.
- Le linee ondeggianti attraverso la cella a flusso indicano che si stanno pompando reagenti lungo la cella a flusso.
- I cambiamenti di colori dello sfondo indicano cambiamenti di temperatura durante la corsa. Il blu corrisponde a temperature più fredde, mentre i colori arancione e rosso indicano temperature più calde.



A Immagine di una cella a flusso High Output (Output elevato): fluidica in avanzamento
B Immagine di una cella a flusso High Output (Output elevato): imaging in avanzamento

- **Configuration** (Configurazione): elenca il tipo di lettura, la cartella di output e i parametri corsa per la corsa in avanzamento. Per espandere la visualizzazione selezionare il pulsante con la freccia.
- **Analysis** (Analisi): mostra un grafico delle intensità secondo il ciclo.
- **Fluidics** (Fluidica): mostra i valori correnti di temperatura, fase del protocollo e reagente. Per espandere la visualizzazione selezionare il pulsante con la freccia.
- **Images** (Immagini): mostra un grafico delle intensità secondo il ciclo mentre la cella a flusso è nella chimica e le miniature mentre la cella a flusso è sottoposta all'imaging.

Conferma report della prima base

Il report della prima base è un file *.htm che fornisce informazioni iniziali su densità cluster, qualità della messa a fuoco e intensità della cella a flusso.

Se durante l'impostazione della corsa si è selezionato **First Base Confirmation** (Conferma prima base), dopo il completamento del ciclo 1 appare automaticamente la finestra di

dialogo conferma report della prima base. Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Advanced (Avanzato)* a pagina 39.

Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV)

Il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV, Sequencing Analysis Viewer) è un'applicazione che permette di visualizzare importanti metriche di sequenziamento generate da Real Time Analysis (RTA), mediante grafici di dispersione, diagrammi e tabelle. SAV si apre automaticamente sulla pagina di analisi dopo che è iniziata l'analisi d'immagine.

Le statistiche vengono aggiornate non appena sono disponibili informazioni nuove sull'analisi. Selezionare **Refresh** (Aggiorna) in qualunque momento durante la corsa per visualizzare metriche aggiornate mentre la corsa procede.

Si può visualizzare SAV in remoto installandolo su un altro computer che abbia accesso alla posizione in rete della cartella di output della corsa. È possibile scaricare una copia del software SAV dal sito Web Illumina. È necessario un login MyIllumina.

Per una descrizione dettagliata delle metriche disponibili e delle istruzioni d'installazione, vedere la *Guida per l'utente del Visualizzatore analisi di sequenziamento*, n. codice 15020619.

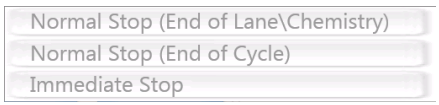
Arresto e riavvio di una corsa

Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa) si può arrestare la corsa. È possibile arrestare la corsa in caso di errata impostazione, se la qualità dei dati è insoddisfacente o se si verifica un errore hardware. Se si prevede di riprendere la corsa, accertarsi di selezionare le opzioni appropriate di arresto normale unitamente a una delle opzioni RTA che permettono di riprendere la corsa.

Opzione di arresto	Opzione RTA	In grado di riprendere?
Normal Stop (End of Lane\Chemistry) [Arresto normale (fine corsia/chimica)]	Keep As Is (Mantenere come si trova)	Sì. La corsa riprende al prossimo comando della chimica o di imaging.
	Complete For Run (Completare per corsa)	Non è possibile riprendere la corsa.
	Complete For Read (Completare per lettura)	Sì. La corsa riprende all'inizio della prossima lettura.
Normal Stop (End of Cycle) [Arresto normale (fine del ciclo)]	Keep As Is (Mantenere come si trova)	Sì. La corsa riprende al prossimo ciclo.
	Complete For Run (Completare per corsa)	Non è possibile riprendere la corsa.
	Complete For Read (Completare per lettura)	Sì. La corsa riprende all'inizio della prossima lettura.
Immediate Stop (Arresto immediato)	No option (Nessuna opzione)	No.

1 Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa), selezionare **Stop** (Arresto). Si apre il menu Stop (Arresto).

Figura 29 Arresto della corsa



2 Selezionare una delle seguenti opzioni di arresto:

- **Normal Stop (End of Lane\Chemistry)** [Arresto normale (fine corsia/chimica)]: arresta la corsa solo dopo il completamento del comando corrente per la chimica o per l'imaging e poi pone la cella a flusso in uno stato sicuro.
- **Normal Stop (End of Cycle)** [Arresto normale (fine del ciclo)]: arresta la corsa dopo il completamento del ciclo corrente e poi pone la cella a flusso in uno stato sicuro.
- **Immediate Stop** (Arresto immediato): arresta la corsa senza completare l'operazione corrente e ***non*** pone la cella a flusso in uno stato sicuro. Non è possibile riprendere una corsa arrestata usando il comando Immediate Stop (Arresto immediato).

3 Selezionare una delle seguenti opzioni RTA:
- **Keep As Is** (Mantenere come si trova): la corsa è arrestata senza alcun cambiamento su RTA. Si può riprendere la corsa da dove la si era lasciata.
- **Complete For Run** (Completare per corsa): si arresta RTA. Le informazioni sulla corsa, i parametri della corsa e i file ricetta vengono aggiornati in modo da far corrispondere i cicli totali secondo l'ultimo ciclo completato. Poi RTA riprende per completare l'analisi della corsa fino al punto in cui la corsa era stata arrestata. L'utente ***non*** sarà in grado di riprendere la corsa.
- **Complete For Read** (Completare per lettura): si arresta RTA. Le informazioni sulla corsa, i parametri della corsa e i file ricetta vengono aggiornati in modo da regolare e ridurre (trim) la lunghezza della lettura corrente secondo l'ultimo ciclo completato. Le letture seguenti non ne sono influenzate. Poi RTA riprende per completare l'analisi della lettura corrente. Si può riprendere la corsa all'inizio della prossima lettura.

4 Dopo l'arresto della corsa, selezionare **Return to Start** (Ritornare all'avvio) sulla schermata Run Overview (Panoramica corsa). Si apre la schermata Welcome (Benvenuto).

Ripresa di una corsa arrestata

Si può riprendere una corsa arrestata se la stessa era stata arrestata in sicurezza utilizzando un'opzione di arresto normale unitamente a una delle opzioni RTA che permettono di riprendere la corsa.

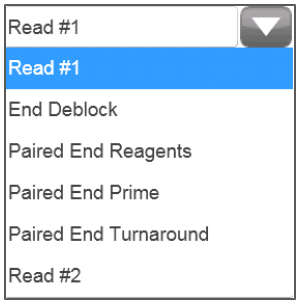
1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Sequence** (Sequenza), e poi selezionare **Resume Run** (Ripresa corsa). Si apre la schermata Resume (Ripresa).

2 Dall'elenco a discesa selezionare la cartella della corsa che si desidera riprendere.

NOTA
Il software riprende la corsa dal punto in cui la stessa era stata interrotta, preimpostando la corretta impostazione sulla schermata Resume (Ripresa).

3 Confermare le impostazioni sulla schermata Resume (Ripresa) o selezionare il punto appropriato della corsa per riprenderla.
- **Resume At** (Riprendi a) presenta un elenco con la lettura o il punto della corsa da cui riprendere.
- **Start At Cycle** (Inizia dal ciclo) presenta un elenco con il ciclo da cui riprendere.

Figura 30 Punti per la ripresa della corsa



ATTENZIONE
Illumina non consiglia di riprendere una corsa al punto d'inversione (turnaround) bidirezionale, salvo che per la re-ibridazione primer Lettura 2. Per maggiori informazioni, vedere *Ripetizione dell'ibridazione primer Lettura 2* a pagina 143.

4 Confermare le impostazioni sulla schermata Resume (Ripresa) o selezionare i comandi di imaging e della chimica per la ripresa. Per maggiori informazioni, vedere *Esempio di impostazioni per il riavvio di una corsa* a pagina 58.

5 Selezionare **Next** (Avanti) per procedere. Il software guida l'utente attraverso le fasi rimanenti di impostazione della corsa.

Esempio di impostazioni per il riavvio di una corsa

Se l'utente ha arrestato la corsa dopo l'imaging della corsia 1 al ciclo 23 di una lettura di 101 cicli, il software stabilisce automaticamente le impostazioni per il riavvio come Read #1 (Lettura 1) at cycle (al ciclo) 23. Sulla schermata Resume (Ripresa) si dovrebbero vedere queste impostazioni:

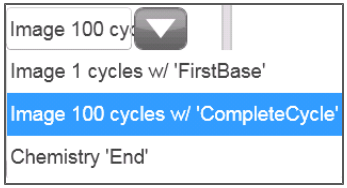
- **Resume At (Riprendi a):** Read #1 (Lettura n. 1)

- **Start At Cycle (Inizia al ciclo):** 23

Figura 31 Esempio di ripresa al ciclo 23

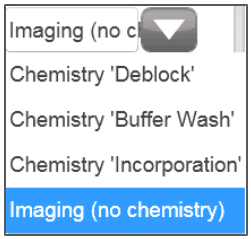
Per una lettura da 101 cicli, c'è un ciclo di **FirstBase** (Prima base) seguito da 100 cicli di **CompleteCycle**. Al ciclo 23, si è nei 100 cicli di CompleteCycle. Dovrebbe essere scelto automaticamente **Image 100 cycles w/ 'CompleteCycle'** (Imaging 100 cicli con 'CompleteCycle').

Figura 32 Esempi di comandi Imaging



Dato che in questo esempio la corsa era stata arrestata durante una fase di imaging, dovrebbe essere scelto automaticamente **Imaging (no chemistry)** [Imaging (nessuna chimica)].

Figura 33 Esempi di comandi Chimica

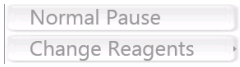


Sospensione (pausing) di una corsa

Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa) si può sospendere la corsa. È possibile che l'utente desideri eventualmente sospendere la corsa per verificarne i componenti, ad esempio i volumi dei reagenti, prima di procedere con la corsa. Secondo le normali procedure, l'utente non ha la necessità di ricorrere a questa funzione. Il software sospende la corsa automaticamente prima delle Lettura 2 (Output elevato) per consentire il caricamento dei reagenti.

1 Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa), selezionare **Pause** (Pausa). Si apre il menu Pause (Pausa).

Figura 34 Opzioni Pausa



2 Selezionare **Normal Pause** (Pausa normale).

3 Selezionare **Yes** (Sì) per confermare il comando pausa. Il software conclude il comando corrente per la chimica o per l'imaging e pone la cella a flusso in uno stato sicuro.

4 Selezionare **Resume** (Ripresa) quando si è pronti a riprendere la corsa.

Sostituzione dei reagenti durante una corsa

Se si è iniziata una corsa con un volume di reagenti solo parziale, utilizzare la funzione Change Reagents (Cambia reagenti) per mettere in pausa la corsa e riempire i reagenti. Per caricare reagente fresco prima della Lettura 2 non è necessario mettere in pausa la corsa; a quel punto il software mette automaticamente in pausa la corsa.

1 Dalla schermata Run Overview (Panoramica corsa), selezionare **Pause** (Pausa). Si apre il menu Pause (Pausa).

2 Selezionare **Change Reagents** (Cambia reagenti).

3 Selezionare **Yes** (Sì) per confermare il comando pausa. Il software conclude il comando corrente per la chimica o per l'imaging e pone la cella a flusso in uno stato sicuro.

4 Sulla schermata Reagent (Reagente) inserire i seguenti parametri del reagente:
- Reagent kit ID (ID kit reagente) per i nuovi reagenti che si stanno caricando.
- Il numero di cicli per i quali si prevede che i reagenti dureranno.

NOTA
Sulla schermata Change Reagents (Cambia reagenti) la casella di spunta priming è disabilitata. Il priming non è necessario.

5 Selezionare **Next** (Avanti) per passare al caricamento dei reagenti.

Cartelle delle corse

Ciascuna corsa di sequenziamento genera una cartella della corsa che contiene i file dei dati e i file di registro.

Nome e percorso cartella della corsa

Durante l'impostazione della corsa, il software chiede all'utente di inserire il percorso della cartella della corsa. Per impostazione predefinita, alla cartella viene assegnato un nome nel seguente formato:

AAMMGG_<Nome workstation>_<Numero corsa>_<ID cella a flusso>

Esempio: 110114_SN106_0716_A90095ACXX

Il numero della corsa viene incrementato di uno ogni volta che si esegue una corsa su un dato strumento. L'ID della cella a flusso inserito durante le fasi d'impostazione della corsa viene aggiunto alla fine del nome della cartella della corsa.

La cartella della corsa è scritta secondo il percorso di output specificato nella schermata Scan (Scansione) durante l'impostazione della corsa. La cartella temporanea della corsa per la cella a flusso A è scritta nell'unità D: e la cartella temporanea della corsa per la cella a flusso B è scritta nell'unità E:.

Contenuto delle cartelle della corsa

Sottocartella	File/cartelle principali	Descrizione
[Livello base]	First_Base_Report.htm	File con metriche di base per il primo ciclo.
	IALog.txt	File di registro per eventi di analisi immagini.
	Foglio campioni (opzionale)	Se si prevede di utilizzare CASAVA, copiare il foglio campioni nel livello base della cartella della corsa. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente di CASAVA*, n. codice 15011196.
	RunInfo.xml	Identifica informazioni ad alto livello della corsa.
	runParameters.xml	Fornisce i parametri d'impostazione per la corsa.
Config		Contiene una copia dei parametri software di configurazione utilizzati per la corsa.

Sottocartella	File/cartelle principali	Descrizione
Data	Status.htm	Contiene metriche specifiche della corsa e di analisi generate durante la corsa.
	Cartella Intensities (Intensità)	Contiene i risultati delle analisi delle immagini. Questa cartella è salvata nella cartella in rete secondo il percorso <Run Folder>\Data, e alla cartella è attribuito lo stesso nome della cartella della corsa sul computer dello strumento.
	CopyLog.txt	File di registro per eventi copia.
	Log.txt	File di registro per analisi delle immagini e identificazione delle basi.
Data\ Intensities (Dati/Intensità)	Cartella BaseCalls	Contiene i risultati RTA della identificazione delle basi.
	config.xml	Contiene informazioni sulla corsa e specifiche rispetto all'analisi delle immagini.
	RTAConfiguration.xml	File di configurazione per RTA in formato *.xml.
Logs	Ricetta_<data>_ <ora>.log	Contiene le informazioni di registro della corsa. Ogni volta che il file di registro raggiunge dimensioni troppo grandi (circa 5 MB), CS avvia un nuovo file di registro.
Recipe	*.xml	Quando l'utente avvia una corsa, una copia della ricetta è spostata nella cartella Recipe (Ricetta). Se l'utente interrompe la corsa e la riavvia successivamente, la ricetta riprende da dove la corsa era stata interrotta.
Thumbnail_ Images	Immagini in miniatura (file *.jpg)	Contiene immagini in miniatura di nove zone provenienti da ciascuna tile, utilizzabili per la risoluzione di eventuali problemi della corsa.

Panoramica sul foglio campioni

Il foglio campioni è un file generato dall'utente in formato *.csv (comma separated values, valori separati da virgola) che contiene informazioni relative a una corsa di sequenziamento. Il foglio campioni viene copiato nella cartella della corsa e utilizzato successivamente per l'analisi.

L'utilizzo di un foglio campioni è opzionale. Se si decide di impiegare un foglio campioni, lo stesso va creato *prima* di avviare la corsa.

NOTA

Per visualizzare i risultati di indicizzazione nel Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV), è essenziale che all'inizio della corsa l'utente carichi un foglio campioni. Per riportare le informazioni di indicizzazione, SAV v1.8 richiede un foglio campioni. Vedere la *Guida per l'utente del Visualizzatore analisi di sequenziamento* n. codice 15020619.

Si può creare il foglio campioni in una serie di applicazioni software come ad esempio Excel o Notepad, oppure utilizzare Experiment Manager Illumina.

Per la creazione del foglio campioni, l'utente si atterrà alle seguenti linee guida:

- Tutte le sequenze indice sono specificate nel campo Index (Indice). Se si stanno eseguendo letture a doppia indicizzazione, gli indici multipli devono essere obbligatoriamente separati da un trattino: ACCAGTAA–GGACATGA.
- Se un campione non contiene una sequenza indice, lasciare vuoto il campo Index.
- Per la validità del foglio campioni, ciascun ciclo in una Lettura Indici per ciascuna corsia ***deve*** avere come minimo una base nel canale rosso (A,C) e una base nel canale verde (G,T) per assicurare un'elaborazione immagini appropriata. Un foglio campioni non valido impedirà l'analisi secondaria appropriata.

Experiment Manager Illumina

Experiment Manager Illumina è un'applicazione basata su una procedura guidata che indica all'utente le operazioni da eseguire per creare il foglio campioni.

Utilizzando Experiment Manager Illumina non solo si riducono gli errori di sintassi, ma fornisce anche richieste di informazioni da applicare al tipo di campione e al flusso di lavoro di analisi da utilizzarsi. L'applicazione presenta una funzione per registrare i parametri della piastra campioni, ad esempio ID (identificatore) del campione, nome del progetto, doppi indici e informazioni del codice a barre. Le informazioni relative alla piastra campioni vengono importate usando Experiment Manager Illumina e si possono importare nel foglio campioni i parametri della piastra campioni.

L'applicazione Experiment Manager Illumina può essere eseguita su qualsiasi piattaforma Windows. Per scaricare il software andare alla pagina di supporto Experiment Manager Illumina sul sito web Illumina (support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/experiment_manager/downloads.ilmn).

Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente di Experiment Manager Illumina*, n. codice 15031335.

Spazio disponibile sul disco

Durante la corsa, al completamento dell'imaging di ciascuna corsia, il software verifica lo spazio disponibile sul disco locale D: e E:. In questo momento non viene controllata la posizione della rete. Se lo spazio sul disco scende al di sotto di una soglia di sicurezza, il software mette in pausa la corsa e pone la cella a flusso in uno stato sicuro.

NOTA
Illumina consiglia di specificare un percorso di rete per la cartella di output della corsa. La cartella di output della corsa è specificata nella schermata Scan (Scansione). Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Flow Cell Set-up (Impostazione cella a flusso)* a pagina 38.

Se lo spazio su disco diventa troppo scarso, per continuare la corsa è necessario che l'utente renda disponibile dello spazio. Quando diventa disponibile sufficiente spazio su disco, la corsa riprende automaticamente.

Il computer dello strumento HiSeq dispone di una capacità di memorizzazione di 2,7 TB per ciascuna cella a flusso, che è uno spazio sufficiente per una corsa da 209 cicli di una cella a flusso High Output (Output elevato).

Capitolo 3

Esecuzione di una corsa di sequenziamento (Output elevato)

Introduzione 68
Flusso di lavoro del sequenziamento (Output elevato) 70
Preparazione dei reagenti SBS 73
Preparazione dei reagenti per l'indicizzazione 79
Inserimento dei parametri della corsa 84
Caricamento e priming dei reagenti 88
Caricamento di una cella a flusso 98
Monitoraggio di una corsa 104
Preparazione dei reagenti per la Lettura 2 106
Caricamento reagenti per la Lettura 2 111

Introduzione

Per eseguire una corsa di sequenziamento (Output elevato) sul sistema HiSeq, prima si preparano i reagenti per la corsa e poi la si imposta utilizzando l'interfaccia HCS. Le fasi di impostazione della corsa includono: inserimento dei parametri della corsa, caricamento e priming dei reagenti, caricamento della cella a flusso High Output (Output elevato) ed esecuzione di una verifica della fluidica.

- I reagenti per la Lettura 1 e le Letture Indici vengono caricati durante l'impostazione della corsa prima di avviarla.
- I reagenti per la risintesi Lettura 2 vengono caricati dopo la conclusione della Lettura 1 e delle Letture Indici.
- Illumina consiglia di preparare e caricare ICB fresco per la Lettura 2. Per maggiori informazioni, vedere *Preparazione ICB* a pagina 75.

Tipi di corse (Output elevato)

Sul sistema HiSeq si possono eseguire sei tipi di corse (Output elevato):

Tipo di corsa	Cicli Lettura 1	Cicli di lettura Indice 1 (i7)	Cicli di lettura Indice 2 (i5)	Cicli Lettura 2	Cicli totali
Unidirezionale, non indicizzata	≤ 101	--	--	--	≤ 101
Unidirezionale, singola indicizzazione	≤ 101	7 * 8 **	--	--	≤ 108 * ≤ 109 **
Unidirezionale, doppia indicizzazione	≤ 101	8	8	--	≤ 117
Bidirezionale, non indicizzata	≤ 101	--	--	≤ 101	≤ 202
Bidirezionale, singola indicizzazione	≤ 101	7 * 8 **	--	≤ 101	≤ 209 * ≤ 210 **
Bidirezionale, doppia indicizzazione	≤ 101	8	7 + 8 ***	≤ 101	≤ 225

* Numero di cicli per librerie a singola indicizzazione.
** Numero di cicli per librerie a doppia indicizzazione.
*** La Lettura Indice 2 di una corsa bidirezionale a doppia indicizzazione include sette cicli addizionali di sola chimica.

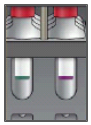
Per maggiori informazioni, vedere *Panoramica sequenziamento a singola indicizzazione* a pagina 11 e *Panoramica sequenziamento a doppia indicizzazione* a pagina 13.

Flusso di lavoro del sequenziamento (Output elevato)

Preparare i reagenti SBS. Questo include lo scongelamento e il capovolgimento di tutti i reagenti.

Per le corse indicizzate:
Preparare i reagenti di indicizzazione. Accertarsi di preparare i primer di sequenziamento appropriati per la libreria e per il tipo di corsa.

Utilizzando il Software di controllo HiSeq (HCS), inserire i parametri della corsa.



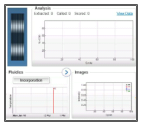
Quando il sistema lo chiede, caricare i reagenti SBS per la Lettura 1 e per la Lettura 2, salvo l'ICB (consigliato).

Per le corse indicizzate:
Caricare i reagenti di indicizzazione. Per le corse a doppia indicizzazione, caricare i reagenti per entrambe le Letture Indici.

Posizionando nello strumento una cella a flusso usata, confermare il flusso corretto alla richiesta dell'interfaccia utente di HCS.

Eseguire il priming dei reagenti SBS e misurare lo scarto del priming.

Caricare una cella a flusso su cui in precedenza si sono generati cluster sul cBot. Confermare il flusso corretto alla richiesta dell'interfaccia utente di HCS.



Avviare la corsa di sequenziamento. Dopo il ciclo 1, ispezionare il report prima base (impostazione opzionale) e poi proseguire la Lettura 1.

Per le corse indicizzate:

Dopo la Lettura 1, la corsa procede con la Lettura Indici (corse a singola indicizzazione) o con due Letture Indici (corse a doppia indicizzazione).

Per le corse bidirezionali:

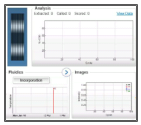
Preparare i reagenti bidirezionali per la risintesi Lettura 2.

Preparare ICB fresco per la Lettura 2 (consigliato).

Per le corse bidirezionali:

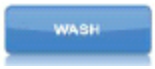
Caricare i reagenti bidirezionali sul rack bidirezionale.

Caricare ICB fresco nella posizione 1 (consigliato).



Per le corse bidirezionali:

Continuare la corsa. Il software esegue automaticamente il priming dei reagenti bidirezionali, la risintesi Lettura 2 e la Lettura 2.



Al termine della corsa, rimuovere e pesare i reagenti.

Eseguire un lavaggio di manutenzione dello strumento.

Durata approssimativa della corsa

La tabella seguente elenca la durata approssimativa di una corsa di sequenziamento (Output elevato) secondo la lunghezza delle letture e la versione del software dello strumento.

Formato corsa	HCS v2.0 o successive con Cella a flusso v3
1 x 36	Circa 2 giorni
2 x 50	Circa 5 giorni
2 x 100	Circa 10 giorni

Preparazione dei reagenti SBS

La prima fase nell'impostazione di una corsa prevede la preparazione dei reagenti SBS. La preparazione dei reagenti richiede lo scongelamento durante la notte a una temperatura tra 2 °C e 8 °C, o a temperatura ambiente in un bagno d'acqua deionizzata per circa 90 minuti. Una volta scongelati, i reagenti sono pronti per l'utilizzo. Incorporation Mix prima dell'utilizzo.

NOTA

I reagenti TruSeq SBS v3 rendono possibile un flusso di lavoro alternativo che prevede il caricamento di tutti i reagenti SBS all'avvio di una corsa di sequenziamento bidirezionale sia per la Lettura 1 che per la Lettura 2. Nonostante nella Lettura 2 questo flusso di lavoro SBS alternativo fornisca prestazioni di sequenziamento accettabili, Illumina raccomanda, per prestazioni ottimali, di preparare e caricare ICB fresco all'inizio della Lettura 2.

Kit SBS per sequenziamento a doppia indicizzazione

Un Kit SBS da 200 cicli fornisce reagenti sufficienti fino a 209 cicli di sequenziamento. Per corse con un totale di più di 209 cicli e per massimizzare l'utilizzo dei reagenti per altre lunghezze di lettura, si possono usare più kit da 50 cicli.

La tabella che segue elenca il numero di kit richiesto per corse a doppia indicizzazione. Per le corse bidirezionali a doppia indicizzazione, nel numero totale di cicli sono calcolati sette cicli di sola chimica.

Tipo di corsa	Cicli della corsa	Totale dei cicli	Opzione kit 1 Kit SBS (200 cicli)	Opzione kit 2 Kit SBS (50 cicli)
Bidirezionale a doppia indicizzazione	101+8+(7)+8+101	225	-	4*
	93+8+(7)+8+93	209	1	4*
	76+8+(7)+8+76	175	1	3
	51+8+(7)+8+51	125	1	3
	36+8+(7)+8+36	95	1	2
Unidirezionale a doppia indicizzazione	101+8+8	117	1	2
	76+8+8	92	1	2
	51+8+8	67	1	2
	36+8+8	52	1	1

* Riempire il contenitore di SRE e SB3 fino alla sommità. Non è necessario reintegrare.

Per maggiori informazioni, vedere *Panoramica sequenziamento a doppia indicizzazione* a pagina 13.

Scongelamento dei reagenti SBS

1 Rimuovere l'SRE e il CMR dal luogo di conservazione tra -15 °C e -25 °C, scongelare e capovolgere secondo le istruzioni indicate nella seguente tabella:

Nome del reagente	Kit SBS (200 cicli)	Kit SBS (50 cicli)
SRE	Scongelare tra 2 °C e 8 °C per 16 ore o in bagno d'acqua a temperatura ambiente per 90 minuti. Capovolgere cinque volte per miscelare. Lasciare su ghiaccio fino a quando non deve essere usato.	Scongelare in un bagno d'acqua a temperatura ambiente per un'ora.
CMR	Scongelare tra 2 °C e 8 °C per 16 ore o in bagno d'acqua a temperatura ambiente per 90 minuti. Capovolgere cinque volte per miscelare. Lasciare su ghiaccio, lontano dai reagenti ICB e SRE fino a quando non deve essere usato.	Scongelare in un bagno d'acqua *separato* a temperatura ambiente per un'ora.

2 Dopo lo scongelamento, riporre l'SRE e il CMR su ghiaccio finché non si è pronti a caricare i reagenti.

3 Rimuovere l'LFN36 dal luogo di conservazione tra -15 °C e -25 °C e scongelare in un becher contenente acqua deionizzata a temperatura ambiente per 20 minuti.

Nome del reagente	Kit SBS (200 cicli)	Kit SBS (50 cicli)
LFN	Scongelare due provette per preparare l'ICB per la Lettura 1. Scongelare le altre due altre provette quando si prepara l'ICB per la Lettura 2 o per una corsa successiva. In alternativa, scongelare quattro provette per preparare l'ICB sia per la Lettura 1 che per la Lettura 2.	Scongelare una provetta. Una provetta di LFN prepara ICB per 58 cicli di sequenziamento.

4 Dopo lo scongelamento, riporre l'LFN36 su ghiaccio finché non si è pronti a preparare l'ICB.

5 Lasciare l'EDP nel luogo di conservazione tra -15 °C e -25 °C finché non si è pronti a preparare l'ICB.

6 Utilizzare l'ICB, l'SB1, l'SB2 e l'SB3 direttamente dal luogo di conservazione tra 2 °C e 8 °C.

7 Registrare sul modulo di monitoraggio del laboratorio il numero del lotto di ciascun reagente.

Preparazione ICB

Preparare l'ICB secondo il tipo di corsa e il formato del kit che si sta utilizzando:

- Per corse non indicizzate o a singola indicizzazione che impiegano un kit da 200 cicli, vedere *Preparazione ICB per Lettura 1 (kit da 200 cicli)* a pagina 76 e *Preparazione ICB per Lettura 2 (kit da 200 cicli)* a pagina 110.
- Per corse non indicizzate o a singola indicizzazione che impiegano un kit da 50 cicli, vedere *Preparazione ICB per 58 cicli (kit da 50 cicli)* a pagina 76.
- Per corse a doppia indicizzazione, vedere *Preparazione ICB per corse a doppia indicizzazione* a pagina 77.
- Per corse non indicizzate o a singola indicizzazione che impiegano il flusso di lavoro alternativo per i reagenti SBS v3, vedere *Preparazione ICB per Lettura 1 e Lettura 2 (kit da 200 cicli)* a pagina 78.

NOTA
Quando si prepara l'ICB, capovolgere delicatamente il flacone di ICB per miscelare. Per prestazioni ottimali, verificare che la temperatura dell'ICB rimanga sotto gli 8 °C.

Preparazione ICB per Lettura 1 (kit da 200 cicli)

Per la preparazione di ICB per una corsa non indicizzata o a singola indicizzazione con un massimo di 2 x 101 cicli attenersi alla procedura descritta qui di seguito. Per corse a doppia indicizzazione, vedere *Preparazione ICB per corse a doppia indicizzazione* a pagina 77.

1. Aliquotare 47 ml di ICB-200 in un flacone di riserva da 250 ml in modo da avere due flaconi di ICB.
2. Conservare il flacone di riserva contenente 47 ml di ICB nel luogo di conservazione a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C fino a quando si è pronti a preparare e caricare i reagenti per la Lettura 2.
3. Aggiungere i contenuti di due provette di LFN al flacone originale di ICB-200.
4. Sciacquare ciascuna provetta di LFN con ICB-200 per assicurarsi che tutto l'LFN sia trasferito.
5. Aliquotare 1,1 ml di EDP-200 nella miscela ICB/LFN.
6. Riporre la porzione non utilizzata di EDP-200 nel luogo di conservazione a una temperatura compresa tra -15 °C e 25 °C.
7. Tappare il flacone e capovolgere *delicatamente* diverse volte per miscelare.
8. Mettere da parte su ghiaccio fino a quando non si è pronti a caricare i reagenti sullo strumento.

Preparazione ICB per 58 cicli (kit da 50 cicli)

Per la preparazione di ICB per un massimo di 58 cicli di sequenziamento attenersi alla procedura descritta qui di seguito.

1. Aggiungere il contenuto di una provetta di LFN al flacone di ICB-50.
2. Sciacquare la provetta di LFN con ICB-50 per assicurarsi che tutto l'LFN sia trasferito.
3. Aggiungere il contenuto di una provetta di EDP-50 al flacone di miscela ICB/LFN.
4. Sciacquare la provetta di EDP-50 con miscela ICB/LFN per assicurarsi che tutto l'EDP sia trasferito.
5. Tappare il flacone e capovolgere *delicatamente* diverse volte per miscelare.

6 Mettere da parte su ghiaccio fino a quando non si è pronti a caricare i reagenti sullo strumento.

Preparazione ICB per corse a doppia indicizzazione

Illumina consiglia la seguente procedura per calcolare il volume di ICB richiesto per una corsa a doppia indicizzazione.

Per maggiori informazioni sul numero di Kit SBS necessari per una corsa a doppia indicizzazione secondo la lunghezza della corsa, vedere *Kit SBS per sequenziamento a doppia indicizzazione* a pagina 73.

1 All'inizio della corsa, aliquotare ICB, LFN e EDP utilizzando i seguenti volumi per ogni dieci cicli di sequenziamento da eseguire. ***Non*** miscelare ICB, LFN e EDP.

Reagente	Volume per dieci cicli	Conservazione
ICB	4,57 ml	da 2 °C a 8 °C
LFN	0,6 ml	da -15 °C a -25 °C
EDP	0,11 ml	da -15 °C a -25 °C

Ad esempio, una corsa da 101 cicli bidirezionali a doppia indicizzazione ha un totale di 225 cicli:

- 124 cicli (101 + 8 + 7 + 8) per la Lettura 1 e per le Letture Indici
- 101 cicli per la Lettura 2

Lettura 1 e Letture Indici (124 cicli)	Lettura 2 (101 cicli)
124 cicli / 10 cicli = 12,4	101 cicli / 10 cicli = 10
• ICB: 12,4 x 4,57 ml = 56,9 ml	• ICB: 10 x 4,57 ml = 45,7 ml
• LFN: 12,4 x 0,6 ml = 7,44 ml	• LFN: 10 x 0,6 ml = 6 ml
• EDP: 12,4 x 0,11 ml = 1,36 ml	• EDP: 10 x 0,11 ml = 1,1 ml

Si può utilizzare lo stesso calcolo per qualsiasi corsa a doppia indicizzazione secondo il numero di cicli nella Lettura 1 e nelle Letture Indici e il numero totale di cicli nella Lettura 2. Per corse bidirezionali a doppia indicizzazione, includere i sette cicli di sola chimica nella Lettura Indice 2.

2 Conservare ciascun volume di ICB, LFN e EDP opportunamente, secondo quanto necessario.
Per corse bidirezionali, conservare le aliquote calcolate per la Lettura 2 fino a che si è pronti a preparare ICB fresco per la Lettura 2.

3 Preparare ICB, LFN e EDP come segue:
   a Aggiungere LFN al flacone di ICB.
   b Sciacquare ogni provetta di LFN con ICB per assicurarsi che tutto l'LFN sia trasferito.
   c Aggiungere EDP alla miscela ICB/LFN.
   d Sciacquare ogni provetta di EDP con miscela ICB/LFN per assicurarsi che tutto l'EDP sia trasferito.
   e Tappare il flacone e capovolgere *delicatamente* diverse volte per miscelare.
   f Mettere da parte su ghiaccio fino a quando non si è pronti a caricare i reagenti sullo strumento.

Preparazione ICB per Lettura 1 e Lettura 2 (kit da 200 cicli)

Se si prevede di utilizzare il flusso di lavoro alternativo e caricare ICB per la Lettura 1 e per la Lettura 2 all'avvio della corsa, per un massimo di 209 cicli attenersi alla procedura descritta qui di seguito per le corse a singola indicizzazione.

1 Aggiungere i contenuti di quattro provette di LFN al flacone di ICB-200.

2 Sciacquare ciascuna provetta di LFN con ICB-200 per assicurarsi che tutto l'LFN sia trasferito.

3 Aggiungere il contenuto di una provetta di EDP-200 al flacone di miscela ICB/LFN.

4 Sciacquare la provetta di EDP-200 con miscela ICB/LFN per assicurarsi che tutto l'EDP sia trasferito.

5 Tappare il flacone e capovolgere *delicatamente* diverse volte per miscelare.

6 Mettere da parte su ghiaccio fino a quando non si è pronti a caricare i reagenti sullo strumento.

Preparazione dei reagenti per l'indicizzazione

Il sequenziamento con indicizzazione richiede reagenti di indicizzazione basati sul tipo di librerie che si stanno sequenziando e sul numero di Letture Indici da eseguire.

- Tutti i tipi di librerie richiedono HP3 e HT2 che sono forniti nel kit TruSeq Cluster.
- Le librerie Nextera a doppia indicizzazione richiedono primer addizionali per sequenziamento forniti nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box. Per il sequenziamento su una cella a flusso unidirezionale utilizzare il kit unidirezionale (single-read), per il sequenziamento su una cella a flusso bidirezionale utilizzare il kit bidirezionale (paired-end).
- Le librerie TruSeq HT a doppia indicizzazione richiedono HP9 (primer Lettura Indice 2) contenuto nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box (Single Read) nel caso si esegua una corsa a doppia indicizzazione su una cella a flusso unidirezionale.

NOTA

I primer di sequenziamento forniti nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box sono compatibili con le librerie non indicizzate e con le librerie a singola indicizzazione. Se la cella a flusso in uso contiene una combinazione di librerie non indicizzate, a singola indicizzazione e a doppia indicizzazione utilizzare i primer di sequenziamento della confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Per maggiori informazioni, vedere *Primer di sequenziamento secondo il tipo di corsa* a pagina 20.

Tipo di libreria e tipo di cella a flusso	Indice 1 (i7)	Indice 2 (i5)
Librerie Nextera Cella a flusso unidirezionale	HP12	HP9
Librerie Nextera Cella a flusso bidirezionale	HP12	RMR
Librerie TruSeq HT Cella a flusso unidirezionale	HP8 o HP12	HP9
Librerie TruSeq HT Cella a flusso bidirezionale	HP8 o HP12	RMR
Librerie TruSeq LT/v2 Cella a flusso unidirezionale o cella a flusso bidirezionale	HP8 o HP12	--
Librerie TruSeq Small RNA Cella a flusso unidirezionale o cella a flusso bidirezionale	HP8 o HP12	--

La preparazione dei reagenti di indicizzazione richiede meno di 30 minuti.

Tabella 2 Reagenti per indicizzazione

Reagenti	Nome del kit
HP3	Kit TruSeq PE Cluster (Indexing Reagents Box)
HT2	Kit TruSeq PE Cluster (Indexing Reagents Box)
HP8 o HP12	Kit TruSeq PE Cluster (Indexing Reagents Box) TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box
HP9	TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box
RMR	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box)

NOTA

HP8, fornito nel kit TruSeq Cluster, non è compatibile con le librerie Nextera a doppia indicizzazione. È obbligatorio utilizzare l'**HP12** contenuto nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

NOTA

I primer di sequenziamento forniti nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box sono compatibili con le librerie non indicizzate e con le librerie a singola indicizzazione. Se la cella a flusso in uso contiene una combinazione di librerie non indicizzate, a singola indicizzazione e a doppia indicizzazione utilizzare i primer di sequenziamento della confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Scongelamento dei reagenti per l'indicizzazione

1. Rimuovere i reagenti dal luogo di conservazione a una temperatura tra -15 °C e -25 °C. Verificare che si stiano utilizzando i primer di sequenziamento appropriati per il tipo di libreria e il tipo di corsa.
2. Scongelare i reagenti in un becher riempito con acqua deionizzata a temperatura ambiente per circa 20 minuti o fino al completo scongelamento.

Preparazione HT2

1. Capovolgere la provetta di HT2 cinque volte per miscelare il reagente.
2. Etichettare la provetta di HT2 come **Reagente n. 19**.
3. Centrifugare il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.
4. Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione HP3 per corse a singola indicizzazione

1. Capovolgere la provetta di HP3 cinque volte per miscelare il reagente e quindi centrifugare a impulsi.
2. Trasferire 3325 µl di PW1 in una provetta conica Sarstedt da 15 ml e aggiungere 175 µl di HP3.
3. Capovolgere la provetta cinque volte per miscelare il reagente.
4. Etichettare la provetta di HP3 diluito come **Reagente n. 18**.
5. Centrifugare a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.
6. Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione HP3 per corse a doppia indicizzazione

NOTA
Al fine di preparare HP3 sufficiente per entrambe le Letture indici (Index Reads) di una corsa a doppia indicizzazione, le istruzioni per la preparazione HP3 differiscono rispetto a quelle per le corse a singola indicizzazione.

1. Capovolgere la provetta di HP3 cinque volte per miscelare il reagente e quindi centrifugare a impulsi.
2. Trasferire 3,8 ml di PW1 in una provetta conica Sarstedt da 15 ml e aggiungere 200 µl di HP3.
3. Capovolgere la provetta cinque volte per miscelare il reagente.
4. Etichettare la provetta di HP3 diluito come **Reagente n. 18**.
5. Centrifugare a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.
6. Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione HP8

1 Capovolgere la provetta di HP8 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Centrifugare brevemente per raccogliere le gocce.

3 Etichettare la provetta di HP8 come **Reagente n. 17**.

4 Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione HP12

Per il sequenziamento di librerie a doppia indicizzazione è obbligatorio l'utilizzo di HP12.

1 Capovolgere la provetta di HP12 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Centrifugare brevemente per raccogliere le gocce.

3 Etichettare la provetta di HP12 come **Reagente n. 17**.

4 Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione HP9

Per corse a doppia indicizzazione su una cella a flusso unidirezionale (single-read) è obbligatorio l'utilizzo di HP9.

1 Capovolgere la provetta di HP9 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Centrifugare brevemente per raccogliere le gocce.

3 Etichettare la provetta di HP9 come **Reagente n. 16**.

4 Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione RMR

Preparazione RMR per corse a doppia indicizzazione su una cella a flusso bidirezionale.

1 Capovolgere la provetta di RMR cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di RMR come **Reagente n. 10**.

3 Centrifugare brevemente il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un massimo di un minuto. In alternativa, battere o scuotere delicatamente la provetta verificando che le gocce di reagente si raccolgano sul fondo.

NOTA
Non utilizzare il vortex per miscelare l'RMR.

4 Riporre su ghiaccio.

Inserimento dei parametri della corsa

L'interfaccia del software HCS guida l'utente attraverso le fasi di impostazione della corsa. Dalla schermata Welcome (Benvenuto) del software CS, selezionare **Sequence** | **New Run** (Sequenzia | Nuova corsa). Si apre la schermata Scan (Scansione).

Schermata Flow Cell Set-up (Impostazione cella a flusso)

NOTA
È fondamentale che quando si imposta la corsa venga scansionato il codice a barre della cella a flusso o venga inserito con precisione l'ID della cella a flusso. Il software utilizza l'ID della cella a flusso per determinare il tipo di cella a flusso e la compatibilità dei reagenti.

1. Eseguire la scansione del codice a barre della cella a flusso o inserire l'ID (numero del codice a barre) della cella a flusso che deve essere sequenziata.
2. Confermare il tipo della cella a flusso, che è selezionato automaticamente secondo l'ID della cella.
3. Inserire il nome dell'esperimento e il nome utente.
4. Selezionare la corsia contenente il controllo, se applicabile. Altrimenti, selezionare **None** (Nessuna).
5. Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Recipe (Ricetta)

1 Selezionare una delle seguenti opzioni di indicizzazione:
- **No Index** (Nessun indice): esegue una corsa non indicizzata unidirezionale oppure bidirezionale.
- **Single Index** (Singolo indice): esegue una corsa unidirezionale oppure bidirezionale con una Lettura Indici (Lettura Indice 1 (i7)).
- **Dual Index** (Doppio indice): esegue una corsa unidirezionale oppure bidirezionale con due Letture Indici (Lettura Indice 1 (i7) e Lettura Indice 2 (i5)).
- **Custom** (Personalizzata): esegue una corsa unidirezionale oppure bidirezionale con un numero di cicli personalizzato per le Letture Indici.

2 Selezionare un formato di cella a flusso, **Single Read** (Unidirezionale) oppure **Paired End** (Bidirezionale). Questa opzione appare in modalità (Output elevato) solo se è stato selezionato Dual Index (Doppio indice) oppure Custom (Personalizzata).

3 Inserire il numero di cicli che l'utente desidera sequenziare per la Lettura 1 e per la Lettura 2, se applicabile.

Se l'utente ha selezionato l'opzione di indicizzazione **Custom** (Personalizzata), inserire il numero di cicli che l'utente desidera per sequenziare le Letture Indici.

NOTA

È possibile eseguire una corsa unidirezionale a doppia indicizzazione utilizzando una cella a flusso bidirezionale contenente librerie bidirezionali. A tale fine, impostare una ***dual-indexed paired-end run*** (corsa bidirezionale a doppia indicizzazione) e inserire zero come numero di cicli nella Lettura 2. Questo arresterà la corsa dopo la Lettura Indice 2 (i5).

4 Confermare le selezioni per la chimica della corsa:

a **SBS**: questa impostazione è determinata dall'ID della cella a flusso.

b **Index** (Indice): questa impostazione è determinata dall'opzione di indicizzazione selezionata. Tuttavia, per le corse a singola indicizzazione l'utente deve obbligatoriamente specificare il nome del kit per assicurare che alla corsa sia applicato il corretto numero di cicli di indicizzazione.
- **Per le librerie non indicizzate o a singola indicizzazione**: selezionare **Multiplexing Primer Box**. Questo imposta la corsa per l'esecuzione di una Lettura Indici a sette cicli.
- **Per le librerie a doppia indicizzazione**: selezionare **TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box**. Questo imposta la corsa per l'esecuzione di una Lettura Indici a otto cicli.

NOTA

Selezionare l'impostazione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box per il sequenziamento di qualsiasi libreria a doppia indicizzazione (Nextera o TruSeq HT) indipendentemente dai primer di sequenziamento che saranno utilizzati per la corsa. Qualsiasi altra impostazione produce una Lettura Indici con meno di otto cicli.

Per maggiori informazioni su quali primer di sequenziamento utilizzare per la corsa, vedere *Primer di sequenziamento secondo il tipo di corsa* a pagina 20.

c **PE turnaround chemistry** (Chimica di inversione PE): questa impostazione è determinata dall'ID della cella a flusso.

5 Selezionare la casella di spunta **Use Existing Recipe** (Usa ricetta esistente) solo se si desidera usare una ricetta personalizzata. Altrimenti, consentire al software di creare la ricetta in base alle informazioni fornite dall'utente nelle schermate di impostazione della corsa.

Schermata Sample Sheet (Foglio campioni)

NOTA

Per visualizzare i risultati di indicizzazione nel Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV), è essenziale che all'inizio della corsa l'utente carichi un foglio campioni. Per riportare correttamente le informazioni di indicizzazione, SAV v1.8 richiede un foglio campioni. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente del Visualizzatore analisi di sequenziamento* n. codice 15020619.

1 Inserire il percorso oppure sfogliare e indicare un foglio campioni valido per la corsa. Per le corse indicizzate, il foglio campioni è richiesto se si desidera che gli indici siano riportati in SAV; un foglio campioni è richiesto anche se si utilizza BaseSpace.

2 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Reagents (Reagenti)

1 Scansionare o inserire l'ID del kit di reagenti. È possibile inserire l'ID del kit dalla confezione 1 o dalla confezione 2.

2 Per le corse indicizzate, scansionare o inserire l'ID del kit Indexing Reagent (Reagenti di Indicizzazione).

3 Per le corse bidirezionali, scansionare o inserire l'ID del kit di reagenti PE o SR.

4 Selezionare il kit di reagenti SBS che si sta utilizzando per la corsa.

- Selezionare **200 Cycles** (200 cicli) per un kit da 200 cicli; selezionare **50 Cycles** (50 cicli) per un kit da 50 cicli.
- Selezionare Used Kit (Kit usato) per un kit parziale, e poi inserire il numero di cicli SBS rimanenti, o il numero di cicli per il quale si prevede che i reagenti durino.

NOTA
Se l'utente sta combinando quattro kit SBS da 50 cicli per una corsa a doppia indicizzazione, selezionare **Used Kit** (Kit usato) invece di 50 Cycles (50 cicli), per impostare correttamente il contatore dei cicli.

5 Il campo Cycles Remaining (Cicli rimanenti) è compilato automaticamente in base al kit SBS che si sta utilizzando. Se si sta utilizzando un kit parziale, inserire il numero di cicli per il quale si prevede che i reagenti durino. Il software esegue un conteggio alla rovescia sul numero di cicli inserito. Quando il numero di cicli comincia a essere basso, il software chiede all'utente di caricare reagenti freschi. Per maggiori informazioni, vedere *Sostituzione dei reagenti durante una corsa* a pagina 60.

NOTA
Se si sta avviando una nuova corsa utilizzando meno di un kit completo di reagenti, fare in modo di essere poi presenti nel momento in cui i reagenti saranno necessari.

- Selezionare **Prime SBS Reagents** (Priming reagenti SBS) per eseguire il priming dei reagenti prima di avviare una corsa. Eseguire sempre il priming dei reagenti prima di caricare una cella a flusso nuova.

6 Selezionare **Next** (Avanti).

Schermata Review (Revisione)

Rivedere le informazioni della corsa. Se sono corrette, selezionare **Next** (Avanti).

Se è necessario modificare degli inserimenti, selezionare **Back** (Indietro).

Caricamento e priming dei reagenti

La fase successiva consiste nel caricamento dei reagenti di sequenziamento. L'interfaccia del software guida l'utente attraverso il processo.

Caricamento dei reagenti SBS

Assicurarsi che i reagenti SBS siano scongelati completamente e pronti per il caricamento sullo strumento.

Materiali di consumo forniti da Illumina

- Otto tappi a imbuto (forniti nel kit TruSeq Cluster)

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Un flacone da 250 ml (Corning, n. di catalogo 430776)

Procedura

1 Registrare il peso di ciascun reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

NOTA
La pesatura dei reagenti prima e dopo la corsa di sequenziamento conferma l'erogazione appropriata del reagente.

2 Aprire lo sportello dello scomparto dei reagenti.

3 Sollevare i pescanti per il rack reagenti di sequenziamento, effettuando i seguenti movimenti:
   a Tirare la maniglia verso di sé.
   b Spingere la maniglia verso l'alto mentre la si tira verso di sé.
   c Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Si dovrebbe sentire che la maniglia è stata posizionata correttamente nell'alloggiamento.

4 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti.

5 Collocare ogni flacone di reagente sul rack nella posizione numerata associata, assicurandosi che l'estremità conica del flacone sia posizionata nella tacca alla base del rack.

Tabella 3 Posizioni dei reagenti SBS

Posizione	Reagente	Descrizione
1	ICB	Incorporation Mix
2	PW1 (25 ml)	Tampone di lavaggio
3	SRE	Scan Mix Reagent
4	SBS Tampone 1 (SB1)	High Salt Buffer
5	SBS Tampone 2 (SB2)	Incorporation Wash Buffer
6	SBS Tampone 2 (SB2)	Incorporation Wash Buffer
7	CMR	Cleavage Mix Reagent
8	SBS Tampone 3 (SB3)	Cleavage Buffer

6 Aggiungere 25 ml di PW1 o di acqua da laboratorio al flacone nella posizione 2.

NOTA
HCS, v2.0 e successive, include un risciacquo automatico post-corsa dopo il completamento della corsa di sequenziamento. In preparazione del risciacquo post-corsa, è importante caricare 25 ml di PW1 o di acqua da laboratorio nella posizione 2 quando si caricano i reagenti SBS all'inizio della corsa.

Il risciacquo post-corsa ***non*** sostituisce il lavaggio post-corsa dello strumento.

7 Rimuovere il tappo da ciascun flacone di reagente e sostituirlo con un tappo a imbuto.

ATTENZIONE
Dopo aver manipolato il flacone di CMR, smaltire i guanti e sostituirli con un nuovo paio.

8 Far scorrere il rack reagenti nello scomparto, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

9 Abbassare i pescanti nei flaconi di reagente di sequenziamento come segue:
   a Tirare la maniglia verso di sé.
   b Abbassare la maniglia mentre la si tira verso di sé.
   c Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nei tappi a imbuto.
   d Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura. Si dovrebbe sentire che la maniglia è stata posizionata correttamente nell'alloggiamento.

10 Selezionare la casella di spunta contrassegnata come **PW1 (25mL) loaded in Position 2** (Caricato 25 ml di PW1 in Posizione 2).

11 Eseguire una delle operazioni seguenti:
- Se si sta eseguendo una corsa indicizzata, selezionare **Next** (Avanti). Il software chiede all'utente di caricare i reagenti per l'indicizzazione.
- Se si sta eseguendo una corsa non indicizzata, chiudere lo sportello dello scomparto dei reagenti e selezionare **Next** (Avanti). Il software passa al priming dei reagenti.

Caricamento dei reagenti di indicizzazione

Se si sta eseguendo una corsa indicizzata, caricare i reagenti di indicizzazione prima di avviare la corsa.

1 Prima di iniziare, registrare il peso di ogni reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

2 Sollevare i pescanti per il rack reagenti PE, effettuando i seguenti movimenti:
   a Tirare la maniglia verso di sé.
   b Spingere la maniglia verso l'alto mentre la si tira verso di sé.
   c Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Si dovrebbe sentire che la maniglia è stata posizionata correttamente nell'alloggiamento.

3 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto dei reagenti usando la maniglia del rack.

4 Posizionare ciascuna provetta dei reagenti sul rack nella posizione numerata associata secondo il tipo di corsa che si sta eseguendo.

Tabella 4 Corsa a singola indicizzazione

Posizione	Reagente	Descrizione
17	HP8 o HP12	Miscela primer sequenziamento Indice 1 (i7)
18	HP3	Soluzione di denaturazione
19	HT2	Tampone di lavaggio

Tabella 5 Corsa a doppia indicizzazione su una cella a flusso unidirezionale

Posizione	Reagente	Descrizione
16	HP9	Miscela primer sequenziamento SR Indice 2 (i5)
17	HP8 o HP12	Miscela primer sequenziamento Indice 1 (i7)
18	HP3	Soluzione di denaturazione
19	HT2	Tampone di lavaggio

Tabella 6 Corsa a doppia indicizzazione su una cella a flusso bidirezionale

Posizione	Reagente	Descrizione
10	RMR	Resynthesis Mix
17	HP8 o HP12	Miscela primer sequenziamento Indice 1 (i7)
18	HP3	Soluzione di denaturazione
19	HT2	Tampone di lavaggio

NOTA
Posizionare le provette riempite con acqua deionizzata nelle posizioni non utilizzate del rack.

5 Rimuovere i tappi da ogni provetta di reagente.

6 Far scorrere il rack reagenti nello scomparto, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

7 Abbassare i pescanti nelle provette sul rack reagenti PE come segue:
   a Tirare la maniglia verso di sé.
   b Abbassare la maniglia mentre la si tira verso di sé.
   c Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nelle provette.
   d Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura. Si dovrebbe sentire che la maniglia è stata posizionata correttamente nell'alloggiamento.

8 Chiudere lo sportello dello scomparto dei reagenti.

9 Selezionare **Next** (Avanti) per passare a *Priming dei reagenti* a pagina 91.

Priming dei reagenti

Eseguire le fasi seguenti per il priming dei reagenti:

- *Pulizia del vano portacella* a pagina 92
- *Caricamento di una cella a flusso usata* a pagina 93
- *Conferma del flusso corretto* a pagina 95
- *Priming dei reagenti* a pagina 96

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Panno per la pulizia delle lenti
- Salviette con alcol o etanolo al 70%

- Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle
- Cella a flusso usata

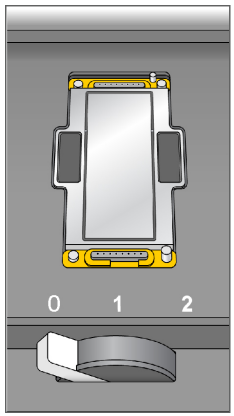
Pulizia del vano portacella

1 Aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

ATTENZIONE
Non porre liquidi sullo sportello dello scomparto della cella a flusso o sul piano della cella a flusso quando lo sportello è aperto. Fuoriuscite di liquido in quest'area possono danneggiare lo strumento.

2 Assicurarsi che la leva della cella a flusso sia in posizione OFF.

Figura 35 Leva della cella a flusso in posizione 0



3 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.

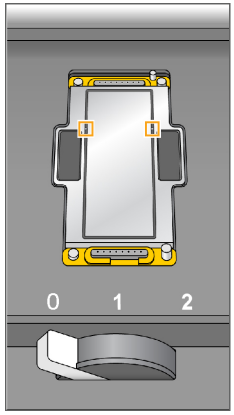
4 Se è presente una cella a flusso utilizzata in una corsa precedente, rimuoverla e metterla da parte. La si può utilizzare per verificare il corretto flusso prima di caricare la cella a flusso con cluster.

5 Usando una salvietta imbevuta di alcol o un tessuto che non lasci fibre, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del supporto della cella a flusso fino a quando non è completamente pulita.

ATTENZIONE
Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

6 Ispezionare visivamente il supporto della cella a flusso per assicurarsi che sia privo di fibre e che i fori della pompa a vuoto siano privi di ostruzioni.

Figura 36 Posizioni dei fori della pompa a vuoto



Caricamento di una cella a flusso usata

1 Sciacquare con acqua da laboratorio la cella a flusso usata. Asciugarla con salviette per la pulizia delle lenti o con un panno che non lasci fibre.

2 Pulire la cella a flusso usando panni imbevuti di alcol e salviette per la pulizia delle lenti.

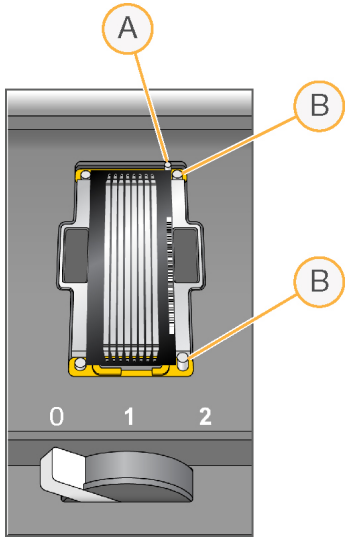
NOTA
Non rimuovere o sostituire le guarnizioni dei collettori in questo momento.

3 Collocare la cella a flusso sul supporto con le porte di ingresso e uscita rivolte verso *il basso* e il codice a barre a destra. La freccia sul bordo sinistro della cella a flusso indica la direzione del flusso e deve puntare verso lo strumento.

4 Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

NOTA
Rimuovere la mano dalla cella a flusso prima di posizionare l'interruttore della pompa a vuoto. Questo previene ogni possibile perdita di allineamento nel tempo.

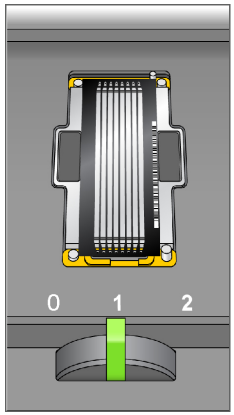
Figura 37 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro.



A Perno guida superiore
B Perni guida destri

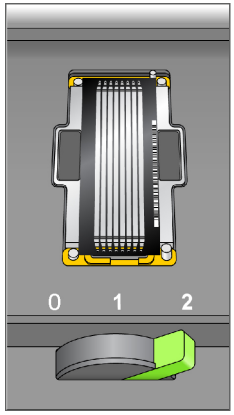
5 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione. Quando la leva della cella a flusso è verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente.

Figura 38 Leva della cella a flusso in posizione 1



6 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione 2 (tutto a destra). Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta per l'uso.

Figura 39 Leva della cella a flusso in posizione 2



7 Assicurarsi che la casella di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata sulla schermata caricamento cella a flusso per il priming e poi selezionare **Next** (Avanti).

Conferma del flusso corretto

Dopo aver caricato la cella a flusso usata, verificare il flusso corretto. La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

1 Selezionare la soluzione 2 (acqua da laboratorio) dall'elenco a tendina.

ATTENZIONE
Si può usare acqua per confermare il flusso corretto solo su una cella a flusso usata. Non usare mai acqua per confermare il flusso corretto su una cella a flusso con cluster.

2 Confermare i valori predefiniti seguenti:
- Volume (Volume): **250**
- Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
- Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**

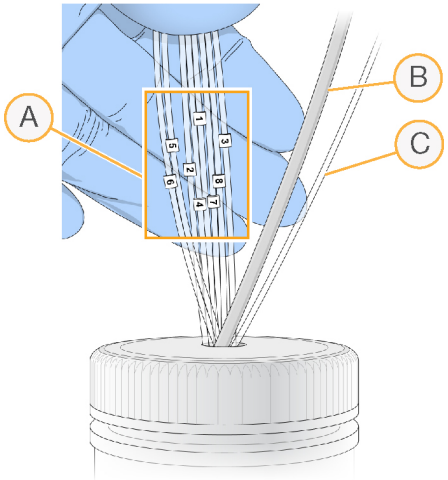
3 Selezionare **Pump** (Pompa).

4 Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
Se si notano bolle eccessive, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni, ridurre la velocità di aspirazione a 100 e pompare altri 250 µl di acqua nella cella a flusso. Se il problema persiste, rimuovere la cella a flusso, ripetere le fasi di pulizia e ricaricare la cella a flusso.

Priming dei reagenti

Allentare e rimuovere gli otto tubi di scarico per la cella a flusso appropriata dal contenitore degli scarti. Assicurarsi di non includere gli otto tubi per la cella a flusso opposta o i tubi della pompa di condensazione o delle pompe di priming paired-end.

Figura 40 Tubi di scarico per un HiSeq 1000



A Tubi di scarico della cella a flusso per le posizioni 1-8
B Tubo della pompa di condensazione (non rimuovere)
C Tubo della pompa del priming paired-end (non rimuovere)

1 Collocare ogni tubo di scarico in una provetta vuota da 15 ml, un tubo per provetta. Gli scarti del priming vengono raccolti e misurati dopo la fase di priming.

2 Selezionare **Next** (Avanti). Si apre la schermata di priming e la fase di priming si avvia automaticamente. È possibile monitorare l'avanzamento della fase di priming dall'apposita schermata.

3 Al completamento della fase di priming, misurare gli scarti di priming raccolti e confermare che il volume sia 2 ml da ciascuna posizione dei reagenti per il priming, ossia un totale di **14 ml**. Registrare i risultati sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

NOTA
Il colore dei rifiuti di priming può apparire marrone. È normale. Il cambiamento nel colore dei rifiuti non indica tossicità e non ha effetto sulle prestazioni.

4 Riposizionare i tubi di scarico nel contenitore degli scarti prima di procedere.

5 Selezionare **Next** (Avanti). Si è pronti per caricare la cella di flusso con cluster.

Caricamento di una cella a flusso

La fase successiva consiste nel rimuovere la cella a flusso usata e nel caricare la cella a flusso che si desidera sequenziare.

Per caricare la cella a flusso eseguire le fasi seguenti:

- *Rimozione di una cella a flusso usata* a pagina 98
- *Pulizia del vano portacella* a pagina 99
- *Pulizia della cella a flusso* a pagina 100
- *Caricamento della cella a flusso* a pagina 101
- *Conferma del flusso corretto* a pagina 103

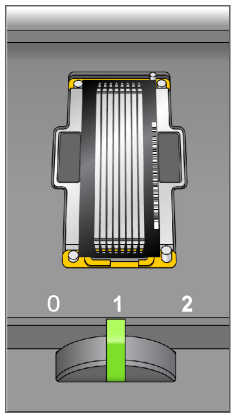
Materiali di consumo forniti dall'utente

- Panno per la pulizia delle lenti
- Salviette con alcol o etanolo al 70%
- Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle

Rimozione di una cella a flusso usata

1 Aprire lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

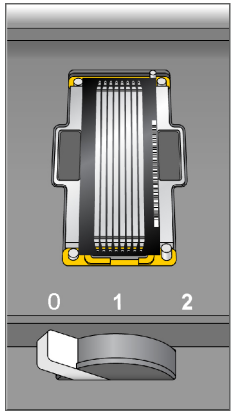
Figura 41 Leva della cella a flusso in posizione 1



2 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per sbloccare i collettori.

3 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 0 per sbloccare la pompa a vuoto e rilasciare la cella a flusso.

Figura 42 Leva della cella a flusso in posizione 0



4 Sollevare la cella a flusso usata dal supporto della cella a flusso.

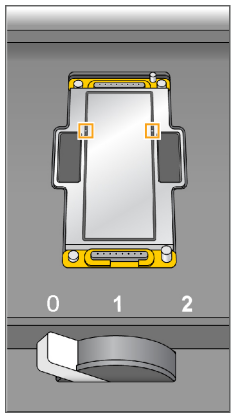
Pulizia del vano portacella

1 Indossare un nuovo paio di guanti in lattice privi di polvere.

2 Usando una salvietta imbevuta di alcol o un tessuto che non lasci fibre, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del supporto della cella a flusso fino a quando non è completamente pulita.

ATTENZIONE
Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

Figura 43 Ispezione dei fori della pompa a vuoto



3 Ispezionare visivamente il supporto della cella a flusso per assicurarsi che sia privo di fibre e che i fori della pompa a vuoto siano privi di ostruzioni.

Pulizia della cella a flusso

1 Sciacquare la cella a flusso con acqua da laboratorio e asciugarla con un panno pulente per lenti.

2 Piegare una salvietta imbevuta di alcol fino approssimativamente alle dimensioni della cella a flusso.

3 Tenere i bordi della cella a flusso con cluster con due dita. Assicurarsi che le porte di ingresso e di uscita siano rivolte *verso l'alto*.

4 Pulire ogni lato della cella a flusso con un unico movimento. Ripetere, ripiegando il panno a ogni passaggio, fino a quando la cella a flusso non è completamente pulita.

5 Asciugare la cella a flusso con un panno pulente per lenti.

ATTENZIONE
Se si pulisce la cella a flusso quando è adagiata sulla parte superiore del banco, è probabile che venga applicata troppa pressione e che la cella a flusso si rompa. Illumina raccomanda di pulire la cella a flusso tenendone i bordi con le dita.

6 Proteggere la cella a flusso dalla polvere fino a quando la si carica sullo strumento.

Caricamento della cella a flusso

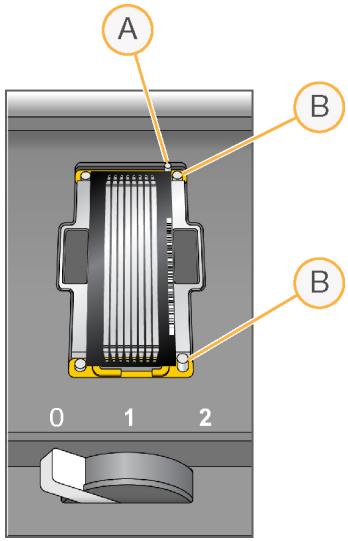
NOTA
Non sostituire le guarnizioni dei collettori in questo momento. Durante il caricamento della cella a flusso con cluster lasciare in sede le guarnizioni che erano state installate prima del lavaggio di manutenzione dello strumento. Le guarnizioni dei collettori verranno sostituite al completamento della corsa di sequenziamento, prima del lavaggio di manutenzione dello strumento.

Non eseguire più di una corsa di sequenziamento sullo stesso set di guarnizioni dei collettori.

1 Collocare la cella a flusso sul supporto con le porte di ingresso e uscita rivolte verso *il basso* e il codice a barre a destra. La freccia sul bordo sinistro della cella a flusso indica le direzione del flusso e deve puntare verso lo strumento.

2 Far scorrere delicatamente la cella a flusso verso i perni guida superiore e destro fino a quando non si blocca.

Figura 44 Cella a flusso posizionata sui perni guida superiore e destro



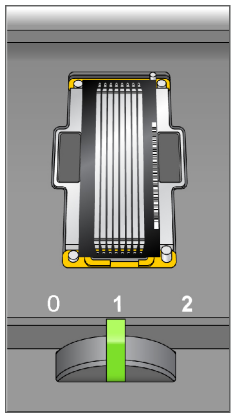
A Perno guida superiore
B Perni guida destri

NOTA

Rimuovere la mano dalla cella a flusso prima di posizionare l'interruttore della pompa a vuoto. Questo previene una possibile perdita di allineamento nel tempo.

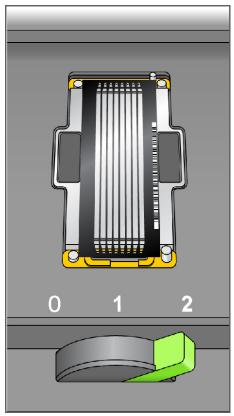
3 Spostare lentamente la leva della cella a flusso in posizione 1 per attivare la pompa a vuoto e assicurare la cella a flusso in posizione. Quando la leva della cella a flusso è verde, la pompa a vuoto è posizionata correttamente.

Figura 45 Leva della cella a flusso in posizione 1



4 Attendere circa cinque secondi, quindi spostare lentamente la leva della cella a flusso nella posizione 2. Quando la leva della cella a flusso è verde fisso, i collettori sono in posizione e la cella è pronta per l'uso.

Figura 46 Leva della cella a flusso in posizione 2



5 Assicurarsi che la casella di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) sia selezionata sulla schermata di caricamento della cella a flusso di sequenziamento.

Conferma del flusso corretto

Dopo aver caricato la cella a flusso, verificare il flusso corretto utilizzando la schermata di verifica della fluidica. La verifica del flusso corretto conferma che la cella a flusso e le guarnizioni sono installate correttamente e che il collettore è posizionato correttamente.

1 Selezionare la soluzione 5 (SB2) dall'elenco a tendina.

2 Inserire i valori predefiniti seguenti:
- Volume (Volume): **250**
- Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
- Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**

3 Selezionare **Pump** (Pompa).

4 Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
Se si notano bolle eccessive, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni dei collettori e ripetere il processo.
   a Selezionare la soluzione 6 (SB2) per evitare di esaurire l'SB2 dalla posizione 5.
   b Ridurre la velocità dell'aspirato a 100 e pompare altri 250 µl di SB2 verso la cella a flusso.

5 Dopo aver confermato il flusso corretto, selezionare **Next** (Avanti) per procedere. Assicurarsi che la leva della cella a flusso sia verde e chiudere lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

6 Confermare che le caselle di spunta **Vacuum Engaged** (Pompa a vuoto attiva) e **Door Closed** (Sportello chiuso) siano selezionate e poi selezionare **Next** (Avanti).

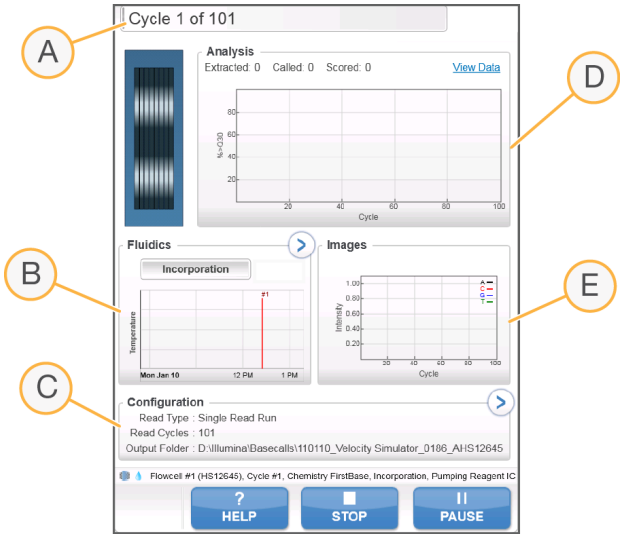
7 Selezionare **Start** (Avvio) per avviare la corsa di sequenziamento.

Monitoraggio di una corsa

Utilizzare la schermata di panoramica della corsa per monitorare l'analisi integrata sullo strumento, la fluidica e l'imaging.

- **Progress Bar** (Barra di avanzamento): utilizzare la barra di avanzamento per monitorare quanti cicli sono stati completati.
- **Flow Cell Image** (Immagine cella a flusso): utilizzare l'immagine della cella a flusso per monitorare di quali corsie è stato eseguito l'imaging per quel ciclo.
- **Analysis Graph** (Grafico dell'analisi): utilizzare il grafico dell'analisi per monitorare i punteggi qualitativi secondo il ciclo.
- **Images Graph** (Grafico delle immagini): utilizzare il grafico delle immagini per monitorare le intensità secondo il ciclo.
- **Fluidics Graph** (Grafico della fluidica): utilizzare il pulsante a freccia per espandere la sezione della fluidica e monitorare le fasi della chimica nel protocollo.

Figura 47 Schermata Run Overview (Panoramica corsa)



A Avanzamento della corsa
B Fluidica e temperatura
C Configurazione corsa
D Analisi
E Immagini

NOTA
È possibile che durante il funzionamento si senta un clic intermittente provenire dal lato destro dello strumento. È normale. I clic indicano che la pompa di condensazione sta lavorando.

Report della prima base

La finestra di dialogo di conferma del report della prima base si apre automaticamente al completamento del primo ciclo, se, durante l'impostazione della corsa, sulla schermata Scan (Scansione) si era selezionato **Confirm First Base** (Conferma prima base). Il ciclo si metterà in pausa a questa fase.

Se la casella di spunta non era stata contrassegnata, la corsa continua dopo l'inclusione della prima base senza chiedere di esaminare il report. Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Advanced (Avanzato)* a pagina 39.

1. Esaminare il report della prima base dalla finestra di dialogo First Base Report Confirmation (Conferma report prima base) oppure aprendo First_Base_Report.htm dal livello base della cartella della corsa.
2. Se i risultati sono soddisfacenti, selezionare **Continue** (Continua) per continuare la corsa. In caso contrario, interrompere la corsa.

Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV)

Si può monitorare la corsa utilizzando il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV, Sequencing Analysis Viewer), che si avvia automaticamente dopo l'inizio dell'analisi delle immagini. Per maggiori informazioni, vedere *Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV)* a pagina 131.

Per una descrizione dettagliata delle metriche disponibili e delle istruzioni d'installazione, vedere la *Guida per l'utente del Visualizzatore analisi di sequenziamento*, n. codice 15020619.

Preparazione dei reagenti per la Lettura 2

Prima della conclusione della Lettura 1 e di ogni eventuale Lettura Indici, preparare i reagenti per la risintesi Lettura 2 e ICB fresco per la Lettura 2. La preparazione dei reagenti richiede meno di 30 minuti.

NOTA
Per prestazioni ottimali, Illumina raccomanda di preparare ICB (Incorporation Mix) fresco per la Lettura 2.

Preparazione dei reagenti bidirezionali (paired-end)

Il sequenziamento bidirezionale richiede i reagenti bidirezionali (paired-end) forniti nel kit TruSeq Cluster.

Le librerie Nextera a doppia indicizzazione richiedono HP11 (primer per sequenziamento Lettura 2) fornito nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Tipo di libreria	Lettura 2
Librerie Nextera	HP11
Librerie TruSeq HT	HP7 o HP11
Librerie TruSeq LT/v2	HP7 o HP11
Librerie TruSeq Small RNA	HP7 o HP11

La preparazione dei reagenti bidirezionali richiede meno di 30 minuti.

NOTA
HP7, fornito nel kit TruSeq PE Cluster, non è compatibile con le librerie Nextera a doppia indicizzazione. È obbligatorio utilizzare l'**HP11** contenuto nella confezione TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box (PE).

Tabella 7 Reagenti bidirezionali

Reagenti	Nome del kit
RMR	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box) **Nota:** Per le corse bidirezionali a doppia indicizzazione non è necessario preparare RMR. RMR è utilizzato durante la Lettura Indice 2 (i5) di una corsa bidirezionale a doppia indicizzazione e non è utilizzato di nuovo durante la risintesi Lettura 2. Nelle corse bidirezionali non indicizzate o a singola indicizzazione, RMR è richiesto e utilizzato durante la fase di inversione bidirezionale.
LMX2	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box)
BMX	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box)
AMX2	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box)
APM2	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box)
AT2	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box)
HP7 o HP11	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box) TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box
HP3	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box)
HT2	Kit TruSeq PE Cluster (PE Reagents Box)

AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali.

Lo smaltimento dei contenitori e dei contenuti non utilizzati avviene secondo gli standard di sicurezza in vigore nel proprio paese.

Per maggiori informazioni, vedere le MSDS per questo kit, all'indirizzo www.illumina.com.

Scongelamento dei reagenti

1. Rimuovere i reagenti dal luogo di conservazione a una temperatura tra -15 °C e -25 °C. Verificare che si stia utilizzando il primer di sequenziamento appropriato per il tipo di libreria e il tipo di corsa.
2. Scongelare i reagenti in un becher riempito con acqua deionizzata a temperatura ambiente per circa 20 minuti o fino al completo scongelamento.
3. Dopo il completo scongelamento dei reagenti, riporre LMX2, BMX, AMX2 e RMR su ghiaccio.

Preparazione RMR

1 Capovolgere la provetta di RMR cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di RMR come **Reagente n. 10**.

3 Centrifugare brevemente il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un un minuto o meno. In alternativa, battere o scuotere delicatamente la provetta verificando che le gocce di reagente si raccolgano sul fondo.

NOTA
Non utilizzare il vortex per miscelare l'RMR.

4 Riporre su ghiaccio.

Preparazione LMX2

1 Capovolgere la provetta di LMX2 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di LMX2 come **Reagente n. 11**.

3 Centrifugare il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.

4 Riporre su ghiaccio.

Preparazione BMX

1 Capovolgere la provetta di BMX cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di BMX come **Reagente n. 12**.

3 Centrifugare il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.

4 Riporre su ghiaccio.

Preparazione AMX2

1 Capovolgere la provetta di AMX2 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di AMX2 come **Reagente n. 13**.

3 Centrifugare il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.

4 Riporre su ghiaccio.

Preparazione APM2

1 Capovolgere la provetta di APM2 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di APM2 come **Reagente n. 14**.

3 Centrifugare il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.

4 Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione AT2

1 Capovolgere la provetta di AT2 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di AT2 come **Reagente n. 15**.

3 Centrifugare il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.

4 Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione HP7

1 Capovolgere la provetta di HP7 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di HP7 come **Reagente n. 16**.

3 Centrifugare il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.

4 Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione HP11

Per il sequenziamento di librerie Nextera a doppia indicizzazione è obbligatorio l'utilizzo di HP11.

1 Capovolgere la provetta di HP11 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di HP11 come **Reagente n. 16**.

3 Centrifugare il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.

4 Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione HP3

1 Capovolgere la provetta di HP3 cinque volte per miscelare il reagente e quindi centrifugare a impulsi.

2 Trasferire 2,85 ml di PW1 in una provetta conica Sarstedt da 15 ml e aggiungere 150 µl di HP3.

3 Capovolgere la provetta cinque volte per miscelare il reagente.

4 Etichettare la provetta conica di HP3 diluito come **Reagente n. 18**.

5 Centrifugare a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.

6 Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione HT2

1 Capovolgere la provetta di HT2 cinque volte per miscelare il reagente.

2 Etichettare la provetta di HT2 come **Reagente n. 19**.

3 Centrifugare il reagente a 1.000 rpm (giri/min) per un minuto.

4 Riporre a temperatura ambiente.

Preparazione ICB per Lettura 2 (kit da 200 cicli)

Per corse non indicizzate o a singola indicizzazione attenersi alla procedura descritta qui di seguito. Per corse a doppia indicizzazione, preparare l'ICB utilizzando i volumi messi da parte per la Lettura 2. Per maggiori informazioni, vedere *Preparazione ICB per corse a doppia indicizzazione* a pagina 77.

1 Aggiungere il contenuto di due provette di LFN al flacone contenente 47 ml di ICB-200.

2 Sciacquare ciascuna provetta di LFN con ICB-200 per assicurarsi che tutto l'LFN sia trasferito.

3 Aliquotare 1,1 ml di EDP-200 nella miscela ICB/LFN.

4 Tappare il flacone e capovolgere diverse volte per miscelare.

5 Mettere da parte su ghiaccio fino a quando non si è pronti a caricare i reagenti sullo strumento.

Caricamento reagenti per la Lettura 2

Dopo il completamento della Lettura 1 e di tutte le eventuali Letture Indici, il software chiede all'operatore di caricare i reagenti bidirezionali per la risintesi Lettura 2 e ICB da una preparazione fresca per la Lettura 2.

Caricamento dei reagenti bidirezionali

1. Registrare il peso di ciascun reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.
2. Sollevare i pescanti per il rack reagenti PE, effettuando i seguenti movimenti:
   a. Tirare la maniglia verso di sé.
   b. Spingere la maniglia verso l'alto mentre la si tira verso di sé.
   c. Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Si dovrebbe sentire che la maniglia è stata posizionata correttamente nell'alloggiamento.
3. Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto dei reagenti usando la maniglia del rack.
4. Posizionare ciascuna provetta dei reagenti sul rack nelle posizioni numerate associate secondo il tipo di corsa che si sta eseguendo.

Tabella 8 Posizioni dei reagenti bidirezionali

Posizione	Reagente	Descrizione
10	RMR	Resynthesis Mix
11	LMX2	Linearization Mix 2
12	BMX	Blocking Mix
13	AMX2	Amplification Mix 2
14	APM2	AMX2 Premix
15	AT2	100% Formammide
16	HP7 o HP11	Primer sequenziamento Lettura 2
18	HP3	Soluzione di denaturazione
19	HT2	Tampone di lavaggio

NOTA
Per le corse bidirezionali a doppia indicizzazione non è necessario caricare RMR. RMR è utilizzato durante la Lettura Indice 2 (i5) e non è utilizzato di nuovo durante la risintesi Lettura 2.

5 Rimuovere i tappi da ogni provetta di reagente.

6 Far scorrere il rack reagenti nello scomparto, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

7 Abbassare i pescanti nei flaconi di reagenti bidirezionali come segue:
   a Tirare la maniglia verso di sé.
   b Abbassare la maniglia mentre la si tira verso di sé.
   c Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nelle provette.
   d Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura. Si dovrebbe sentire che la maniglia è stata posizionata correttamente nell'alloggiamento.

Caricamento ICB per la Lettura 2

1 Registrare il peso del reagente sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

2 Sollevare i pescanti per il rack reagenti di sequenziamento, effettuando i seguenti movimenti:
   a Tirare la maniglia verso di sé.
   b Spingere la maniglia verso l'alto mentre la si tira verso di sé.
   c Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Si dovrebbe sentire che la maniglia è stata posizionata correttamente nell'alloggiamento.

3 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto reagenti.

4 Rimuovere il flacone esistente del reagente ICB dalla posizione 1 del rack reagenti e rimuovere il tappo a imbuto dal flacone.

5 Collocare il tappo a imbuto sul nuovo flacone di ICB e caricare il flacone nella posizione 1, assicurandosi che l'estremità conica del flacone sia posizionata nella tacca alla base del rack.

6 Far scorrere il rack reagenti nello scomparto, allineando il rack con la guida sulla parte inferiore dello scomparto.

7 Abbassare i pescanti nei flaconi di reagente di sequenziamento come segue:
   a Tirare la maniglia verso di sé.
   b Abbassare la maniglia mentre la si tira verso di sé.
   c Ispezionare visivamente i pescanti per assicurarsi che non si pieghino mentre si abbassano nei tappi a imbuto.
   d Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte inferiore della scanalatura. Si dovrebbe sentire che la maniglia è stata posizionata correttamente nell'alloggiamento.

8 Chiudere lo sportello dello scomparto dei reagenti e poi selezionare **Next** (Avanti) per riprendere la corsa.

Capitolo 4

Procedure post-corsa

Introduzione 116
Rimozione e pesatura dei reagenti 117
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione dello strumento 118
Esecuzione di un lavaggio con acqua 122
Porre lo strumento nello stato inattivo (idling) 124
Spegnimento dello strumento 125

Introduzione

Le procedure post-corsa includono la rimozione e la pesatura dei reagenti e il lavaggio dello strumento.

I lavaggi eseguiti regolarmente assicurano la continuità della resa prestazionale dello strumento per i seguenti motivi:

- Eliminano gli eventuali residui di reagenti e campione dai tubi della fluidica e dai pescanti
- Impediscono l'accumulo e la cristallizzazione dei sali nei tubi della fluidica e nei pescanti
- Impediscono la contaminazione crociata con corse precedenti

NOTA

Un lavaggio con acqua viene sempre eseguito al termine di ogni corsa per lavare il sistema e per controllare la fluidica. HCS non permette di avviare una nuova corsa se non è stato eseguito un lavaggio con acqua o un lavaggio di manutenzione richiesto entro le ultime 24 ore. Ogni 10 giorni, HCS richiede di eseguire un lavaggio di manutenzione indipendentemente dall'ultimo lavaggio di manutenzione eseguito.

Rimozione e pesatura dei reagenti

1 Aprire lo sportello dello scomparto dei reagenti.

2 Sollevare i pescanti per il rack reagenti e il rack cluster che si sta caricando, effettuando i seguenti movimenti:
   a Tirare la maniglia verso di sé.
   b Spingere la maniglia verso l'alto mentre la si tira verso di sé.
   c Rilasciare la maniglia nell'alloggiamento nella parte superiore della scanalatura. Si dovrebbe sentire che la maniglia è stata posizionata correttamente nell'alloggiamento.

3 Far scorrere il rack reagenti fuori dallo scomparto dei reagenti usando la maniglia del rack.

4 Rimuovere ogni flacone dal rack dei reagenti e registrare il peso sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

NOTA

Il colore dei rifiuti del reagente di sequenziamento può apparire marrone. Si potrebbe anche osservare una leggera decolorazione sui tappi a imbuto o in eventuali fuoriuscite. Il cambiamento nel colore dei rifiuti non indica tossicità e non ha effetto sulle prestazioni.

AVVERTENZA

Un componente nel kit dei reagenti cluster contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali.

Lo smaltimento dei contenitori e dei contenuti non utilizzati avviene secondo gli standard di sicurezza in vigore nel proprio paese.

Per maggiori informazioni, vedere le MSDS per questo kit, all'indirizzo http://www.illumina.com/msds.

Esecuzione di un lavaggio di manutenzione dello strumento

Per garantire prestazioni ottimali dello strumento, eseguire un lavaggio di manutenzione dello strumento in base alla programmazione seguente:

- Ogni 10 giorni
- Dopo ogni corsa di sequenziamento

Cambiare la guarnizione al momento del lavaggio di manutenzione. Il lavaggio di manutenzione è composto da tre fasi di lavaggio:

- **First water wash** (Primo lavaggio con acqua): lava il sistema con acqua da laboratorio.
- **NaOH wash** (Lavaggio con NaOH): lava il sistema con NaOH.
- **Final water wash** (Lavaggio finale con acqua): lava il sistema con acqua da laboratorio per rimuovere lo NaOH.

Posizioni	Tempo di esecuzione approssimativo per fase
Otto posizioni SBS	20 minuti
Otto posizioni SBS e dieci posizioni cluster	60 minuti

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Salviette imbevute di etanolo
- 24 flaconi, 250 ml (Corning, n. di catalogo 430776), otto flaconi per fase di lavaggio
- 30 provette, 15 ml (Corning, n. di catalogo 430052), dieci provette per fase di lavaggio
- Acqua da laboratorio
- 1 N NaOH
- 3 provette eppendorf per cella a flusso per le fasi di lavaggio della stazione di caricamento campioni

Primo lavaggio con acqua

1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto) di HCS, selezionare **Wash** | **Maintenance** (Lavaggio | Manutenzione).

2 Selezionare **Yes** (Sì) per lavare le posizioni dei reagenti PE. Altrimenti, selezionare **No** (No). Selezionare **Next** (Avanti) per procedere.

3 Caricare lo strumento con acqua da laboratorio come segue:
   a Riempire otto flaconi da 250 ml con più acqua da laboratorio rispetto alla quantità di reagenti presenti all'inizio della corsa per assicurare che i pescanti siano sciacquati.
   b Se si stanno lavando posizioni cluster, caricare dieci provette da 15 ml con 10 ml da acqua da laboratorio.
   c Caricare i flaconi e le provette sullo strumento nel rack appropriato dei reagenti.

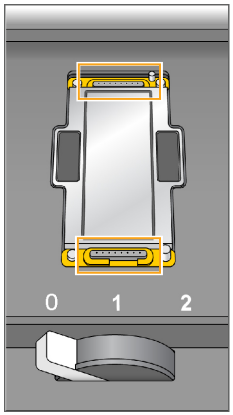
4 Rimuovere la cella a flusso dal piano della cella a flusso e metterla da parte. Questa stessa cella a flusso sarà ricaricata prima di avviare il lavaggio dello strumento.

NOTA
Le guarnizioni non dovrebbero essere cambiate durante le fasi di lavaggio con NaOH e del secondo lavaggio; dovrebbero essere tenute installate fino al completamento della corsa di sequenziamento.

Installare ***sempre*** nuove guarnizioni dei collettori prima di eseguire un lavaggio di manutenzione dello strumento.

5 Assicurarsi di indossare i guanti protettivi e rimuovere le guarnizioni anteriore e posteriore. Applicare una leggera pressione con il dito su un lato della guarnizione. L'altro lato salterà fuori. Utilizzare delle pinzette per afferrare e rimuovere ciascuna guarnizione.

Figura 48 Rimozione delle guarnizioni usate dei collettori



6 Posizionare due nuove guarnizioni negli alloggiamenti sul lato anteriore e posteriore del supporto della cella a flusso.

7 Caricare la cella a flusso che era stata rimossa per installare le nuove guarnizioni. Selezionare **Next** (Avanti).

8 Eseguire una verifica della fluidica:
   a Selezionare la soluzione 2 dall'elenco a tendina.
   b Inserire i valori predefiniti seguenti:
      — Volume (Volume): **250**
      — Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
      — Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**
   c Selezionare **Pump** (Pompa).
   d Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.

9 Fissare insieme le otto linee dei tubi di scarico con parafilm, assicurandosi di tenere tutte le estremità allo stesso livello. Collocare le estremità dei tubi legati a un flacone da 250 ml.

10 Selezionare **Next** (Avanti).

11 Quando il lavaggio è completato, misurare il volume erogato.

NOTA
La pompa di priming è lavata durante le fasi di lavaggio. Tenere separati gli scarti dalla pompa di priming.

Le tabelle seguenti elencano i volumi di lavaggio provenienti dalle otto linee di tubi di scarico. Essi non includono il volume di lavaggio della pompa di priming.

Posizioni	Volume erogato
Otto posizioni SBS	32 ml
Otto posizioni SBS e dieci posizioni cluster	72 ml

Lavaggio con NaOH

ATTENZIONE
Per ragioni di sicurezza, quando si lavora con grandi volumi di NaOH si devono indossare occhiali di sicurezza.

1 Caricare lo strumento con 1 N di NaOH come segue:

a Caricare otto flaconi da 250 ml con 5 ml di NaOH.
b Se si stanno lavando le posizioni cluster, caricare dieci provette da 15 ml con 5 ml di NaOH.

2 Caricare i flaconi e le provette sullo strumento nel rack appropriato dei reagenti.

3 Selezionare **Next** (Avanti) per avviare il lavaggio con NaOH.

4 Quando il lavaggio con NaOH è completo, misurare il volume erogato.

Posizioni	Volume erogato
Otto posizioni SBS	16 ml
Otto posizioni SBS e dieci posizioni cluster	36 ml

Lavaggio finale con acqua

1 Caricare lo strumento con acqua da laboratorio come segue:
a Caricare otto flaconi da 250 ml con almeno 20 ml di acqua da laboratorio.
b Se si stanno lavando le posizioni bidirezionali, caricare dieci provette da 15 ml con almeno 10 ml di acqua da laboratorio.

ATTENZIONE
Non riutilizzare la stessa acqua o i flaconi del lavaggio utilizzati per la prima fase di lavaggio. L'acqua della prima fase di lavaggio potrebbe essere contaminata da reagenti presenti sui pescanti.

2 Caricare i flaconi e le provette sullo strumento nel rack appropriato dei reagenti.

3 Selezionare **Next** (Avanti) per avviare il lavaggio finale con acqua.

4 Quando il lavaggio finale con acqua è completato, misurare il volume erogato.

Posizioni	Volume erogato
Otto posizioni SBS	32 ml
Otto posizioni SBS e dieci posizioni cluster	72 ml

5 Liberare i tubi di scarico e riposizionarli nel contenitore per gli scarti.

Esecuzione di un lavaggio con acqua

Eseguire un lavaggio con acqua se lo strumento è rimasto inattivo per uno o più giorni prima di avviare una nuova corsa di sequenziamento.

NOTA
HCS non permette di avviare una nuova corsa se lo strumento è stato inattivo per più di 24 ore.

Prima dell'avvio di ogni corsa, assicurarsi di aver eseguito la verifica della fluidica raccomandata, nel momento in cui il software lo richiede, per assicurarsi che la fluidica funzioni correttamente.

Materiali di consumo forniti da Illumina

- Acqua da laboratorio

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Otto flaconi da 250 ml (Corning, n. di catalogo 430776)
- Dieci provette coniche da 15 ml (Corning, n. di catalogo 430052)
- Un provetta eppendorf con tappo flip-top per ogni cella a flusso

Procedura

1. Dalla schermata Welcome (Benvenuto) di HCS, selezionare **Wash** | **Water** (Lavaggio | Acqua).
2. Caricare lo strumento con acqua da laboratorio come segue:
   a. Riempire otto flaconi da 250 ml con 20 ml di acqua da laboratorio.
   b. Se si stanno lavando posizioni bidirezionali, caricare dieci provette da 15 ml con 10 ml da acqua da laboratorio.

   NOTA
   Prima di un lavaggio con acqua non è richiesta la sostituzione delle guarnizioni dei collettori.
3. Accertarsi che sia caricata una cella a flusso usata. Se necessario, caricare una cella a flusso usata. Selezionare **Next** (Avanti).

NOTA
Illumina raccomanda una verifica della fluidica se per il lavaggio è stata caricata una cella a flusso usata.

4 Se è stata caricata una cella a flusso usata nella fase precedente, eseguire una verifica della fluidica:
   a Selezionare la soluzione 2 dall'elenco a tendina.
   b Inserire i valori predefiniti seguenti:
      — Volume (Volume): **250**
      — Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
      — Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**
   c Selezionare **Pump** (Pompa).
   d Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.

5 Allentare e rimuovere le otto linee di tubi di scarto per la cella a flusso dal contenitore degli scarti. Assicurarsi di non includere i tubi per la pompa di condensazione o per la pompa di priming cluster.

6 Fissare insieme tutte le linee dei tubi di scarico con parafilm, assicurandosi di tenere tutte le estremità allo stesso livello. Collocare le estremità dei tubi legati a un flacone da 250 ml.

7 Selezionare **Next** (Avanti) per avviare il lavaggio con NaOH.

Posizioni	Tempo di esecuzione approssimativo
Otto posizioni SBS	20 minuti
Otto posizioni SBS e dieci posizioni bidirezionali	60 minuti

8 Quando il lavaggio è completato, misurare il volume erogato. Registrare il volume di erogazione sul modulo di monitoraggio del laboratorio.

Posizioni	Volume erogato
Otto posizioni SBS	32 ml
Otto posizioni SBS e dieci posizioni cluster	72 ml

9 Riposizionare i tubi degli scarti nel flacone degli scarti.

Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)

Se lo strumento non sarà utilizzato nei dieci giorni successivi, prepararlo per l'inattività. Se lo strumento non sarà usato per più di dieci giorni, vedere *Spegnimento dello strumento* a pagina 125.

1. Eseguire un lavaggio di manutenzione completo, per lavare completamente lo strumento. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione dello strumento* a pagina 118.
2. Lasciare la cella a flusso sul piano della cella a flusso con la leva della cella in posizione 2. Questo lascia i collettori nella posizione sollevata.
3. Caricare 10 ml di acqua da laboratorio in ciascuna posizione dei reagenti nei rack reagenti, quindi abbassare i pescanti nell'acqua.
4. Lasciare lo strumento acceso.
5. Quando l'utente è pronto per utilizzare lo strumento per un'altra corsa, eseguire un lavaggio con acqua. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio con acqua* a pagina 122.

Spegnimento dello strumento

Spegnere lo strumento solo se rimarrà inattivo per più di dieci giorni. Se lo strumento sarà utilizzato entro i dieci giorni successivi, vedere *Porre lo strumento nello stato inattivo (idling)* a pagina 124. Se lo strumento viene spento, non è necessario spegnere il PC.

Attenersi alla seguente procedura per porre la fluidica in uno stato di sicurezza e per spegnere il sistema.

1. Eseguire un lavaggio di manutenzione completo, per lavare completamente lo strumento. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione dello strumento* a pagina 118.
2. Rimuovere la cella/le celle a flusso dal piano della cella a flusso.
3. Usando una salvietta imbevuta di alcol o un tessuto che non lasci fibre, imbevuto di etanolo o isopropanolo, pulire la superficie del supporto della cella a flusso fino a quando non è completamente pulita.

ATTENZIONE
Non far sgocciolare l'alcol nei fori della pompa a vuoto o intorno ai collettori. Se necessario, utilizzare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per asciugare il piano.

4. Caricare 10 ml di acqua da laboratorio in ciascuna posizione dei rack reagenti, quindi abbassare i pescanti nell'acqua.
5. Spegnere lo strumento.
6. Quando l'utente è pronto a riavviare lo strumento, caricare l'acqua in tutte le posizioni dei reagenti, accendere lo strumento ed eseguire un lavaggio con acqua. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio con acqua* a pagina 122.

Analisi in tempo reale (RTA)

Capitolo 5

Panoramica dell'Analisi in tempo reale (RTA) 128
Monitoraggio delle statistiche di durata della corsa 130
Dati di output dell'Analisi in tempo reale (RTA) 132

Panoramica dell'Analisi in tempo reale (RTA)

Il software integrato per l'analisi primaria RTA (Real Time Analysis) esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi e assegna un punteggio qualitativo a ciascuna base per ciascun ciclo. L'analisi viene eseguita durante i cicli di chimica e di imaging di una corsa di sequenziamento, il che fa risparmiare tempo di analisi a valle, permettendo di decidere velocemente se la corsa sta avanzando come previsto.

L'analisi in tempo reale (RTA) viene eseguita automaticamente sul computer dello strumento ed è configurata attraverso l'interfaccia CS all'inizio di una corsa.

NOTA

Se per qualsiasi motivo l'analisi RTA smette di funzionare, il software riprende automaticamente l'analisi durante il ciclo successivo nel punto appropriato della cella a flusso. Non riavviare l'applicazione manualmente.

Trasferimento dei dati

L'output di una corsa di sequenziamento è costituito da un gruppo di file di identificazione delle basi qualitativamente valutate (file *.bcl), che sono generati dai file immagine non elaborati e includono le basi identificate per ciclo. Per impostazione predefinita, le immagini vengono eliminate dal computer dello strumento dopo l'analisi. Per l'analisi a valle i dati delle immagini non elaborate non sono necessari.

Se per una qualsiasi ragione, l'analisi d'immagine accumula un ritardo eccessivo, il software arresta la corsa di sequenziamento e pone la cella a flusso in uno stato sicuro. Il sequenziamento riprende una volta che i problemi di analisi d'immagine siano stati risolti.

Basecalling_Netcopy_complete

Il trasferimento dei dati è completato quando i file Basecalling_Netcopy_complete sono presenti nel livello base della cartella della corsa. Deve essere presente un file generico denominato Basecalling_Netcopy_complete.txt, più un file per ciascuna lettura.

Analisi dei dati RTA

Lo script configureBclToFastq.pl di bcl2fastq e CASAVA v1.8 ha la capacità di convertire i file da bcl a fastq e di effettuare il de-multiplexing dei dati indicizzati simultaneamente. Tuttavia, lo script configureBclToFastq.pl di CASAVA 1.8 non è compatibile con i file bcl compressi. Bcl2fastq gestirà la conversione bcl ed effettuerà il de-multiplexing sia dei file bcl compressi che non compressi.

Per l'analisi di dati di output di RTA da corse di sequenziamento a doppia indicizzazione è richiesto CASAVA v1.8.2 o successiva oppure bcl2fastq 1.8.3 o successiva. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente di CASAVA v1.8*, n. codice 15011196.

Monitoraggio delle statistiche di durata della corsa

Real Time Analysis (RTA, Analisi in tempo reale) genera automaticamente metriche di qualità quando inizia l'analisi delle immagini. Non tutte le metriche sono disponibili durante i primi cicli, poiché per generare i dati alcuni processi richiedono cicli multipli. Il sommario qui di seguito descrive i punti della corsa in corrispondenza dei quali sono disponibili le metriche:

- **Image Analysis** (Analisi immagini) - inizia dopo il ciclo 4. Il software deve prima generare una griglia con le posizioni dei cluster. Al ciclo 4, il software comincia l'analisi delle immagini.

NOTA

Dato che il software comincia l'analisi delle immagini durante il ciclo 4, il completamento del ciclo 4 richiede molto più tempo. Il software attende che l'analisi sia conclusa prima di procedere con il ciclo successivo. Tale comportamento è normale.

- **Phasing Estimates and Base Calls** (Determinazione fasi e identificazione basi): il software genera le stime di fase e pre-fase (phasing e prephasing) e base call dopo il ciclo 12.
- **Quality Scores** (Punteggi qualitativi): il software genera i punteggi qualitativi dopo il ciclo 25. Il software determina le letture che passano il filtro qualitativo, applicando la formula Chastity sulle prime 25 basi. Almeno 24 dei primi 25 cicli devono avere un valore Chastity di >0,6. Le letture possono passare il filtro qualitativo se una sola delle prime 25 basi presenta un valore Chastity inferiore. I punteggi qualitativi verranno riportati solo per le letture che passano il filtro qualitativo. Per maggiori dettagli, vedere Teorie di funzionamento RTA.
- **Error Rates** (Tassi d'errore): se si era incluso un controllo PhiX, RTA genera i tassi d'errore dopo il ciclo 25.
- **In-Line Controls** (Controlli in linea): se si erano preparati i campioni con i kit preparazione campioni TruSeq, RTA eseguirà l'allineamento dei controlli in linea al ciclo 52 di ciascuna lettura o alla fine della lettura nel caso di lunghezza della lettura inferiore a 52 cicli.
- **Index Count** (Conteggio indici): dopo il completamento dell'ultima lettura indici, RTA riporta il conteggio indici per corsia se si era fornito un foglio campioni.

Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV)

Il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV, Sequencing Analysis Viewer) è un'applicazione che permette di visualizzare importanti metriche di sequenziamento generate da Real Time Analysis (RTA), mediante grafici di dispersione, diagrammi e tabelle. SAV si apre automaticamente sulla pagina di analisi dopo che è iniziata l'analisi d'immagine.

Le statistiche vengono aggiornate non appena sono disponibili informazioni nuove sull'analisi. Selezionare **Refresh** (Aggiorna) in qualunque momento durante la corsa per visualizzare metriche aggiornate mentre la corsa procede.

Si può visualizzare SAV in remoto installandolo su un altro computer che abbia accesso alla posizione in rete della cartella di output della corsa. È possibile scaricare una copia del software SAV dal sito Web Illumina. È necessario un login MyIllumina.

Per una descrizione dettagliata delle metriche disponibili e delle istruzioni d'installazione, vedere la *Guida per l'utente del Visualizzatore analisi di sequenziamento*, n. codice 15020619.

Pagina Analysis (Analisi)

La pagina Analysis (Analisi) riporta il progresso dell'analisi e fornisce l'accesso alle più importanti statistiche di durata della corsa.

Le statistiche vengono aggiornate non appena sono disponibili informazioni nuove sull'analisi. Le statistiche di durata della corsa sono visibili da qualsiasi computer con accesso alla cartella relativa alla corsa dell'esperimento. Andare alla cartella <RunFolder>\Data e aprire il file Status. Il file Status (Stato) viene trasferito alla sottocartella Data (Dati) nella cartella dell'analisi al termine di ogni ciclo elaborato.

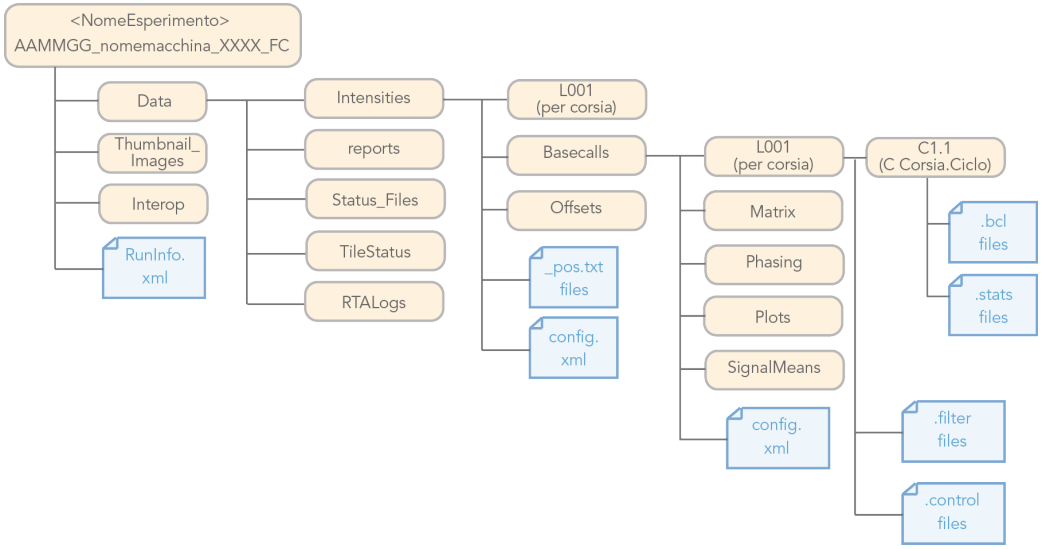
NOTA
Il browser potrebbe avvisare l'utente sulla presenza di contenuto attivo. In questo caso, fare clic sull'avviso nella barra delle informazioni per sbloccare il contenuto.

Dati di output dell'Analisi in tempo reale (RTA)

I risultati di output di RTA sono salvati sull'unità di rete specificata durante le fasi d'impostazione della corsa.

Tutti i risultati dell'analisi sono salvati in una cartella di output dell'analisi alla quale è attribuito lo stesso nome della cartella della corsa sul computer dello strumento. La figura che segue illustra l'organizzazione della cartella dell'analisi in rete, incluse le posizioni dei file di output più importanti (caselle blu).

Figura 49 Cartella Analisi in tempo reale (RTA)



Risultati dell'analisi

Tabella 9 Contenuto della cartella Analysis (Analisi) in rete

File principale	Sottocartella	Descrizione
file *.bcl	AnalysisFolder\Data\Intensities\Basecalls\L00X\CX.X	Ogni file *.bcl contiene i risultati dell'identificazione e della valutazione qualitativa delle basi eseguite dal software RTA per un ciclo e una tile. Questi file sono l'input per CASAVA v1.8.2 o per il Convertitore BCL. Per maggiori informazioni, vedere *File principali di output del sequenziamento* a pagina 136.
file *.cif	AnalysisFolder\Data\Intensities\L00X\CX.X	Ogni file *.cif binario contiene i risultati dell'analisi delle immagini eseguita dal software RTA per un ciclo e una tile. Questi file devono essere utilizzati nel software di analisi OLB se si desidera eseguire la identificazione delle basi BUSTARD; per una descrizione, vedere la *Guida per l'utente del Software offline Basecaller*.
file *.clocs/*.locs	AnalysisFolder\Data\Intensities\L00	Questi file contengono la posizione x, y per ogni cluster. Il file *.clocs è una versione compressa del file *.locs.
file *.filter	AnalysisFolder\Data\Intensities\Basecalls	I file *.filter contengono i risultati di filtraggio per tile. Questi file sono utilizzati da CASAVA v1.8.2 o successiva.
File *.jpg	AnalysisFolder\Thumbnail_Images\L00X\CX.X	CS è in grado di generare immagini in miniatura di nove zone provenienti da ciascuna tile. Le miniature sono generate per ciascun ciclo e base e sono utilizzabili per la risoluzione di eventuali problemi della corsa. Per maggiori informazioni, vedere *Immagini in miniatura (thumbnail)* a pagina 137.
file *.stats	AnalysisFolder\Data\Intensities\Basecalls\L00X\CX.X	I file *.stats contengono le statistiche di identificazione delle basi eseguita dal software RTA per un dato ciclo e una data tile. Questi file sono utilizzati da CASAVA v1.8.2 o successiva.

File principale	Sottocartella	Descrizione
file *_pos.txt	AnalysisFolder\Data\Intensities\	Riporta le coordinate dei cluster. C'è un file *_pos.txt per ciascuna tile. Questi file devono essere utilizzati nel software di analisi OLB se si desidera eseguire la identificazione delle basi BUSTARD.
config.xml	AnalysisFolder\Data\Intensities\ AnalysisFolder\Data\Intensities\Basecalls\	Contiene meta-informazioni sulla corsa, sull'analisi delle immagini e sulla identificazione delle basi.
CopyLog.txt	AnalysisFolder\Data	Tutti gli eventi copia effettuati durante l'analisi sono memorizzati nel file CopyLog.
ErrorLog.txt	AnalysisFolder\Data	Qualsiasi errore durante l'analisi è memorizzato nel file ErrorLog. Se non ci sono errori, non viene generato alcun file ErrorLog.txt.
RunInfo.xml	AnalysisFolder\	Identifica i limiti delle letture (comprese le letture indici), il Flowcell ID (ID della cella a flusso) (se disponibile) e la tabella qualità selezionata per la corsa.
SampleSheet.csv	AnalysisFolder\ AnalysisFolder\Data\Intensities\Basecalls\	Contiene informazioni sul campione, incluse le informazioni di indicizzazione. RTA copia il file Sample Sheet dalla cartella base della corsa alla cartella Basecalls.

Numerazione delle tile

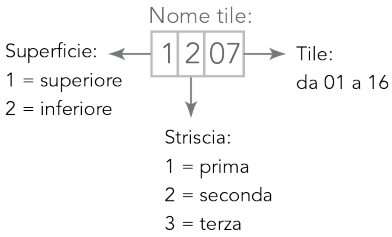
Il nome della tile è un numero di quattro cifre che codifica la posizione sulla cella a flusso.

- La prima cifra codifica la superficie:
  - 1 è per la superficie superiore
  - 2 è per la superficie inferiore
- La seconda cifra codifica la striscia:
  - 1 è per la prima striscia
  - 2 è per la seconda striscia
  - 3 è per la terza striscia (solo sulla cella a flusso v3)

NOTA
Una striscia è una colonna di tile. Sono utilizzate due strisce per corsia per superficie, sulla cella a flusso v3 sono utilizzate tre strisce per corsia per superficie.

- Le ultime due cifre codificano la tile, da 01 a 16 (con HCS v2.0). La numerazione delle tile inizia da 01 sul lato di output della cella a flusso, proseguendo fino a 16 sul lato di input.

Figura 50 Numerazione delle tile



L'esempio indica una tile sulla superficie superiore della cella a flusso, nella seconda striscia, settima tile.

File principali di output del sequenziamento

I seguenti tipi di file di output contengono i dati dell'analisi primaria generati dal software RTA (Real Time Analysis):

File di identificazione delle basi

Un file di identificazione delle basi (base call, *.bcl) contiene le identificazioni delle basi e i punteggi qualitativi per un ciclo e per una tile. Questi file possono essere utilizzati successivamente per l'analisi su un computer che non coincide con quello dello strumento.

NOTA

Se si sta utilizzando CASAVA v1.7 o precedente, è necessario convertire i file *.bcl al formato _qseq.txt in OLB o mediante il Convertitore BCL per rendere possibile l'analisi a valle. Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente del Convertitore BCL* o la *Guida per l'utente del Software offline Basecaller*.

Questa fase non è necessaria con CASAVA v1.8.2 o successiva.

File di statistica

Un file di statistica (Stats) è un file binario che contiene la statistica di identificazione delle basi per i cluster che superano il filtro. Questi file sono utilizzati dal Convertitore BCL e da CASAVA v1.8.

File filtro

I file filtro (*.filter) sono file binari che contengono i risultati del filtro. Questi file sono utilizzati dal Convertitore BCL e da CASAVA v1.8.

File controllo

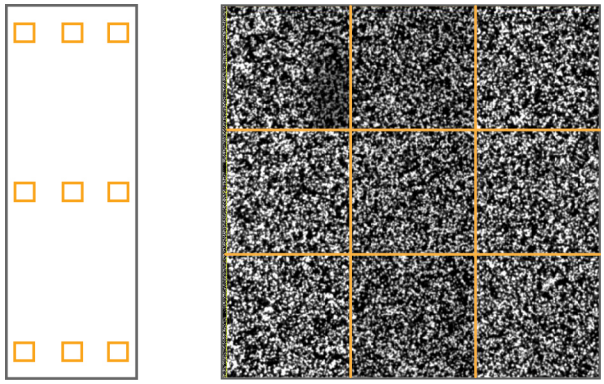
I file controllo (*.control) sono file binari che contengono i risultati del controllo. Questi file sono utilizzati dal Convertitore BCL e da CASAVA v1.8.

Immagini in miniatura (thumbnail)

CS può essere configurato in modo da generare immagini in miniatura (thumbnail) in formato *.jpg. Si generano immagini in miniatura per ciascun ciclo e base.

CS raccoglie immagini da nove zone di una tile. Le nove immagini sono combinate in un'unica miniatura e sono utilizzabili per la risoluzione di eventuali problemi della corsa. Le immagini in miniatura non sono adatte per l'analisi d'immagine.

Figura 51 Immagine in miniatura (thumbnail)



Risoluzione dei problemi

Capitolo 6

Introduzione 140
Possibili problemi d'impostazione della corsa 141
Esecuzione di una verifica della fluidica 142
Ripetizione dell'ibridazione primer Lettura 2 143
Se BaseSpace non è disponibile 144

Introduzione

Questa sezione descrive le possibili soluzioni da parte dell'utente nel caso di problemi durante una corsa di sequenziamento e come eseguire una verifica della fluidica dalla schermata Welcome (Benvenuto).

Possibili problemi d'impostazione della corsa

Problema	Possibile causa	Intervento
Il software non ha eseguito l'inizializzazione.	Il software non è stato in grado di inizializzare i dispositivi hardware interni.	Chiudere il messaggio d'errore e poi ri-lanciare il software dello strumento. Se il problema persiste, riavviare il computer dello strumento. Se si riavvia il computer, lo strumento deve essere per prima cosa spento per assicurarsi che il drive DoNotEject sia riconosciuto correttamente. Se il problema persiste dopo il riavvio del computer dello strumento, spegnere lo strumento, attendere almeno 60 secondi e poi riavviare lo strumento.
La leva della cella a flusso è arancione.	La cella a flusso non è collocata correttamente. Si è persa la chiusura a vuoto. I collettori non si sono sollevati.	Rimuovere la cella a flusso e ripetere le fasi di pulizia. Verificare che le guarnizioni siano presenti e posizionate correttamente. Riposizionare la cella a flusso.
Erogazione fluido scadente.	Bolle potenziali nel sistema.	Riposizionare la cella a flusso e confermare che i fori siano rivolti verso il *basso*. Osservare se è presente del precipitato bianco attorno alle guarnizioni. Se è presente del precipitato, sostituire le guarnizioni. Prima del lavaggio di manutenzione dello strumento sostituire sempre le guarnizioni. Confermare che i gruppi dei pescanti siano completamente abbassati e che ciascun pescante sia a contatto con i reagenti.

Esecuzione di una verifica della fluidica

Il pulsante Check (Controllo) sulla schermata Welcome (Benvenuto) permette di eseguire una verifica della fluidica quando non si sta impostando una corsa. Utilizzare questa opzione durante l'installazione dello strumento e durante la risoluzione dei problemi della fluidica.

1. Caricare sullo strumento una cella a flusso usata. Per maggiori informazioni, vedere *Caricamento di una cella a flusso usata* a pagina 93.
2. Caricare otto flaconi da 250 ml con soluzione di lavaggio o con acqua da laboratorio e caricare i flaconi sul corrispondente rack reagenti. Caricare il rack sullo strumento.
3. Selezionare **Check** (Controllo) sulla schermata Welcome (Benvenuto).
4. Selezionare la soluzione 5 (SB2) dall'elenco a tendina. Se si sta eseguendo una verifica della fluidica con installata una cella a flusso usata, si può selezionare la soluzione 2, che è acqua.
5. Inserire i valori predefiniti seguenti:
   - Volume (Volume): **250**
   - Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **250**
   - Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2000**
6. Selezionare **Pump** (Pompa). Se è necessario mettere in pausa la verifica della fluidica, selezionare **Pause** (Pausa).
7. Ispezionare visivamente la cella a flusso per escludere la presenza di bolle che attraversino le corsie e di perdite vicino ai collettori.
   Se si notano bolle eccessive, verificare la presenza di ostruzioni nelle guarnizioni dei collettori, ridurre la velocità di aspirazione a 100 e pompare altri 250 µl di acqua nella cella a flusso.

Ripetizione dell'ibridazione primer Lettura 2

È possibile ripetere l'ibridazione del primer Lettura 2 sullo strumento, tuttavia sono necessari dei reagenti addizionali. Rivolgersi all'Assistenza tecnica Illumina per valutare meglio se sia appropriata una re-ibridazione Lettura 2.

Per maggiori informazioni, visitare la pagina di supporto HiSeq sul sito Web Illumina e fare clic su **Troubleshooting** (Risoluzione dei problemi). È necessario un login MyIllumina.

Se BaseSpace non è disponibile

Se BaseSpace non è disponibile, aprire Servizi di Windows e assicurarsi che Illumina BaseSpace Broker sia avviato; in caso contrario, riavviarlo. Se i servizi sono in esecuzione ma non è ancora possibile accedere a BaseSpace, contattare l'assistenza tecnica Illumina.

Indice

A

Analisi in tempo reale
    pagina di analisi 55, 131
Analisi in tempo reale (RTA) 26
    cartella dell'analisi 132
    con corsa arrestata 56
    pagina di stato 131
    risultati dell'analisi 133
    statistiche durata 130
    trasferimento dati 128
archiviazione
    BaseSpace 35
arresto di una corsa 56
arresto normale 56
assistenza clienti 149
assistenza tecnica 149

B

bidirezionali
    reagenti 106

C

caricamento dei reagenti 88, 117
caricamento reagenti 111
cartella dell'analisi 132
cartella ricette 62
cartelle corse 62
cella a flusso
    caricamento 91, 98
    compatibilità delle versioni 21
    ID cella a flusso 38, 84
    leva 93, 101
    pulizia 100
    risoluzione dei problemi 141
cicli in una lettura 41
compatibilità delle versioni
    materiali di consumo 21
    software 21
componenti
    modulo ottica 4
    scomparto dei reagenti 4-5, 117
    scomparto della cella a flusso 4, 6, 91
    scomparto fluidica 4
config.xml 62, 134

D

documentazione 149
doppia indicizzazione
    impostazioni sulla schermata Recipe (Ricetta) 85
    panoramica 13
    su cella a flusso bidirezionale 85
durata della corsa 71

F

file bcl 133, 136
file cif 133
file clocs 133
file control 136
file filter 133, 136
file locs 133
file pos.txt 134
file stats 133, 136
fluidica, risoluzione dei problemi 141
flusso 99
flusso di lavoro
    durata della corsa 71
foglio campioni
    caricamento 43
    editor 64
    nella cartella corsa 62
    panoramica 64
    schermata Sample Sheet (Foglio campioni) 43

G

guarnizioni dei collettori 19, 118

I

ibridazione Lettura 2 143
icona
  errori e avvertenze 32
icona avviso stato 32
icone
  avviso stato 32
immagini
  immagini in miniatura 35
  salvataggio campioni immagini 35
inclusione prima base
  conferma 39, 54, 105
  posizione report 39, 62
indicatori di attività 32
indicizzazione
  reagenti 79
inizializzazione del software 28

L

lavaggi
  guarnizioni dei collettori 118
  lavaggio con acqua 30, 116, 122
  lavaggio di manutenzione 30, 116, 118
  materiali di consumo 118, 122
  raccomandazioni 116
  volumi erogati 118, 122
lavaggio con acqua 116
lavaggio di manutenzione 116, 118
lavaggio strumento 116, 122
librerie a doppia indicizzazione 15
  primer per 19-20
librerie Nextera 16
librerie TruSeq HT 16
lunghezza lettura 41

M

materiali di consumo
  compatibilità delle versioni 21
  forniti dall'utente 22
  kit di sequenziamento Illumina 17
materiali di consumo forniti dall'utente 22
materiali di consumo sequenziamento 17
modulo ottica 4
monitoraggio 104
  campioni immagini 104
  fluidica corsa 104
  intensità dei cluster 104
mostrare file di registro 28

N

numerazione delle tile 135

P

pagina analisi 131
pagina di analisi 55, 131
pagina di stato 104
porre lo strumento nello stato inattivo (idling) 124
posizioni dei reagenti
  bidirezionali 111
  indicizzazione 90
preparazione dei campioni
  kit per doppia indicizzazione 16
primer di sequenziamento 20
priming
  preparazione 96
  volume degli scarti 96
punteggi qualitativi
  generazione 130

R

reagenti
  bidirezionali 111
  caricamento 90, 111, 117
  caricamento, ICB 112
  caricamento, SBS 88
  compatibilità delle versioni 21
  priming 96
  registrazione ID kit 43
  schermata Reagents (Reagenti) 43
  sequenziamento 117
  tappi a imbuto 19
reibridizzazione primer 143
report
  contenuti cartelle corse 62
  inclusione prima base 39, 62, 105
requisiti primer 20

revisione schermata impostazione corsa 84
ripresa della corsa 30
risoluzione dei problemi 141
risultati analisi 136
risultati base calling 62
risultati dell'analisi 133
RunInfo.xml 62, 134

S

SAV 55, 105, 131
schermata Flow Cell Set-up (Impostazione cella a flusso) 38
schermata Reagents (Reagenti) 43
schermata Recipe (Ricetta) 84
schermata Review (Revisione) 45
schermata Run Overview (Panoramica corsa) 53, 104
schermata Sample Sheet (Foglio campioni) 43
schermata Scan (Scansione) 84
schermata Storage (Archiviazione) 35
scomparto dei reagenti 4-5, 117
scomparto della cella a flusso 4, 6, 91
scomparto fluidica 4
sequenziamento a indicizzazione
  reagenti, caricamento 90
sequenziamento bidirezionale
  reagenti, caricamento 111
singola indicizzazione
  panoramica 11
software
  Analisi in tempo reale (RTA) 26
  compatibilità delle versioni 21
  durata della corsa 71
  Experiment Manager 64
  info su, versione 28
  inizializzazione 23
  inizializzazione manuale 28
  mostrare file di registro 28
  risoluzione dei problemi 141
  RTA
    analisi in tempo reale 128
  Software di controllo HiSeq 26, 66
  visualizzare a schermo intero 28
  Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) 26
Software di controllo HiSeq 26
Software di controllo HiSeq (HCS) 66
spazio su disco, verifica 66
spegnimento strumento 125
status.xml 62
striscia 35
suono con clic 104
suono, con clic 104

T

tappi a imbuto 19
trasferimento dati 128

V

verifica fluidica 142
Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) 26, 55, 105, 131

Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Tabella 10 Dati di contatto generali Illumina

Sito Web Illumina	www.illumina.com
Email	techsupport@illumina.com

Tabella 11 Numeri di telefono Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Numero di contatto	Area geografica	Numero di contatto
Nord America	1.800.809.4566	Italia	800.874909
Austria	0800.296575	Paesi Bassi	0800.0223859
Belgio	0800.81102	Norvegia	800.16836
Danimarca	80882346	Spagna	900.812168
Finlandia	0800.918363	Svezia	020790181
Francia	0800.911850	Svizzera	0800.563118
Germania	0800.180.8994	Regno Unito	0800.917.0041
Irlanda	1.800.812949	Altri paesi	+44.1799.534000

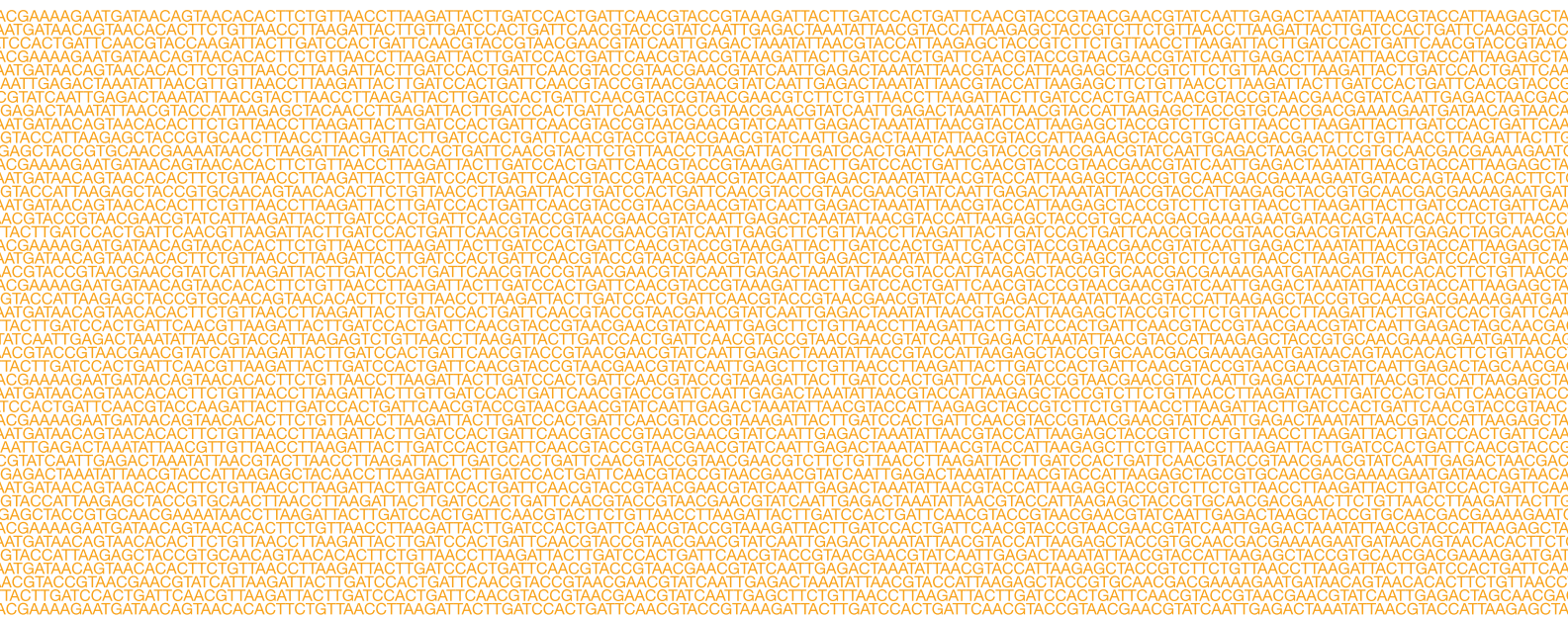
MSDS

Le schede di sicurezza sui materiali (MSDS) sono disponibili sul sito Web Illumina all'indirizzo http://www.illumina.com/msds.

Documentazione dei prodotti

È possibile scaricare ulteriore documentazione relativa ai prodotti in formato PDF dal sito Web Illumina. Andare all'indirizzo www.illumina.com/support e selezionare un prodotto. È necessario un login MyIllumina. Per registrarsi per un account MyIllumina, andare all'indirizzo my.illumina.com/Account/Register.

N. codice 15023355 Rev. K ITA



Illumina
San Diego, California, U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com